



**FACULTAD DE MEDICINA**

**DETERMINANTES GENÉTICOS DE LOS  
NIVELES PLASMÁTICOS DE COLESTEROL  
HDL EN POBLACIÓN PREPUBERAL**

**TESIS DOCTORAL**

**LAURA LÓPEZ SIMÓN**

**Madrid, 2007**

*Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Lípidos de la Fundación Jiménez Díaz, dirigida por los Dres. Carmen Garcés y Manuel de Oya y financiada por la Fundación Conchita Rábago, el F.I.S. n° 02/3104, FIS n° 05/0389 y la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña Automovilística*

## RESUMEN

Las concentraciones de colesterol HDL (C-HDL) se relacionan con el riesgo cardiovascular, de forma que los niveles plasmáticos de C-HDL de la población infantil se han correlacionado de forma inversa con la incidencia de enfermedad cardiovascular en el adulto en distintos países. En España, los niveles de C-HDL en niños son elevados y han permanecido estables en los últimos años de modo independiente a variaciones en la dieta, sugiriendo la existencia de un fuerte componente genético. Por ello, en este estudio nos propusimos analizar si polimorfismos frecuentes en genes de proteínas claves del metabolismo de las HDL y sus interacciones con factores ambientales se relacionan con los elevados niveles de C-HDL descritos en nuestra población. Para ello analizamos la relación con el perfil lipídico de los polimorfismos: *MspI* -75 y *MspI* +83 en el gen de la Apo AI, *Taq IB* en el gen de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), *PON192* y *PON55* en el gen de la paraoxonasa 1, y *R219K* y *V771M* en el gen de la proteína transportadora ABCA1, en 1255 niños españoles de 6 a 8 años de edad integrantes del primer corte del Estudio Cuatro Provincias. Las frecuencias de los polimorfismos estudiados son similares a las descritas en otras poblaciones caucásicas. Hemos observado una importante asociación del polimorfismo *Taq IB* de *CETP* con niveles elevados de C-HDL y Apo AI. Sin embargo, en el caso del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* su relación con niveles de Apo AI solo se observa en aquellos niños en los que la ingesta de grasa total y saturada es baja y en el caso de los polimorfismos *R219K* y *V771M* de *ABCA1* esta asociación está influida por los niveles de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) y por el IMC. Nuestros resultados muestran que los niveles de C-HDL y Apo AI en población prepuberal son el resultado de múltiples interacciones entre determinantes genéticos, dieta y aspectos hormonales.

## SUMMARY

Plasma HDL-C levels are related to cardiovascular risk. HDL-C levels in schoolchildren have been inversely correlated to the coronary heart disease mortality rates in the different countries studied. In Spain, plasma HDL-C levels in children are high. These levels have remained practically unchanged over the last years and do not seem to be related to environmental factors such as diet, suggesting a genetic determination. Thus, in this study we aimed to analyze whether common polymorphisms on candidate genes for HDL metabolism and their interactions with environmental factors are related to the high HDL-C levels in our population. Therefore, we have analyzed the relationship between lipid profile and the polymorphisms: *MspI* -75 and *MspI* +83 in the Apo AI gene, *Taq IB* in the cholesterol ester transfer protein (CETP) gene, *PON192* and *PON55* in the paraoxonase 1 gene, and *R219K* and *V771M* in the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) gene, in 1255 Spanish children aged 6 to 8 years, that participated in the first phase of the Four Provinces Study. The polymorphism frequencies in our study are similar to those described in other Caucasian populations. We have observed an important association between the *Taq IB* CETP polymorphism and high HDL-C and Apo AI levels. However, the association between the *MspI* -75 APOAI polymorphism and Apo AI levels have been found only in those children with low total and saturated fat intakes, and the association of the *R219K* and *V771M* ABCA1 with the lipid profile has shown to be influence by the dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) levels. Our results show that HDL-C and Apo AI levels in our prepuberal population are the result of multiple interactions between genetic determinants, diet and hormone levels.

## **ABREVIATURAS**

<b>ABC</b>	ATP binding cassette
<b>ABCA1</b>	ATP binding cassette A1
<b>ANOVA</b>	Análisis de las varianzas
<b>APO</b>	Apolipoproteína
<b>ATP</b>	Adenosin-trifosfato
<b>ATS</b>	Asistente técnico sanitario
<b>CETP</b>	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
<b>CFCA</b>	Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos
<b>C-HDL</b>	Colesterol transportado en lipoproteínas de alta densidad
<b>CI</b>	Cardiopatía Isquémica
<b>C-LDL</b>	Colesterol transportado en lipoproteínas de baja densidad
<b>CT</b>	Colesterol Total
<b>DHEA-S</b>	Dehidroepiandrosterona Sulfato
<b>EC</b>	Enfermedad Cardiovascular
<b>ET</b>	Enfermedad de Tangier
<b>FL</b>	Fosfolípidos
<b>HF</b>	Hipoalfalipoproteinemia Familiar
<b>IDL</b>	Lipoproteínas de Densidad Intermedia
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>LCAT</b>	Lecitin: colesterol aciltransferasa
<b>LH</b>	Lipasa Hepática
<b>LPL</b>	Lipoproteín lipasa
<b>r-LDL</b>	Receptor de las lipoproteínas de baja densidad
<b>LRP</b>	Receptor relacionado con r-LDL

<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PLTP</b>	Proteína de transferencia de fosfolípidos
<b>PON1</b>	Paraoxonasa 1
<b>QM</b>	Quilomicrón
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico
<b>SR-BI</b>	Receptor Sacavenger BI
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>RLFP</b>	Restriction Length Fragment Polymorphism
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TRC</b>	Transporte reverso de colesterol
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad

## *ÍNDICE*

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Niveles de C-HDL y riesgo cardiovascular	1
1.1. Niveles de C-HDL en la infancia y riesgo cardiovascular en el adulto	3
2. Metabolismo de las HDL. Transporte reverso de colesterol	4
3. Alteraciones del metabolismo de las HDL	11
4. Factores determinantes del colesterol HDL	12
5. Alteraciones genéticas de las apolipoproteínas	15
5.1. Apolipoproteína AI	15
5.2. Apolipoproteína AII	17
5.3. Apolipoproteína E	17
5.4. Apolipoproteína AV	18
6. Alteraciones genéticas en enzimas y proteínas de transferencia	19
6.1. Proteína transportadora de ésteres de colesterol	19
6.2. Paraoxonasa 1	21
7. Alteraciones genéticas en proteínas transportadoras	23
7.1. Transportadores ABCA1	23
 <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	 <b>28</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	 <b>29</b>
1. Selección de la muestra	29
2. Obtención de la muestra	30
2.1. Determinaciones bioquímicas	32
2.2. Determinaciones genéticas	33
2.2.1. Obtención del DNA y cuantificación del DNA	33



2.2.2. Determinación de los polimorfismos estudiados	35
❖ <i>MspI</i> -75 y +83 de <i>APOAI</i>	35
❖ <i>Taq IB</i> de <i>CETP</i>	38
❖ <i>PON192</i> y <i>PON55</i> de <i>PON1</i>	40
❖ <i>R219K</i> y <i>V771M</i> de <i>ABCA1</i>	44
3. Medidas físicas	48
4. Información alimentaria y nutricional	48
5. Entrega de resultados	49
6. Análisis estadístico	50
<b>RESULTADOS</b>	<b>52</b>
1. Descripción de la muestra	52
❖ Análisis descriptivo de las variables antropométricas y bioquímicas	52
❖ Análisis de correlación de las variables antropométricas con las variables bioquímicas	53
2. Resultados del análisis del polimorfismo <i>MspI</i> en la posición -75 de la región promotora del gen de la apolipoproteína AI	54
2.1. Frecuencias del polimorfismo <i>MspI</i> -75 de <i>APOAI</i>	54
2.2. Influencia del polimorfismo <i>MspI</i> -75 de <i>APOAI</i> sobre los niveles plasmáticos de lípidos	55
2.3. Influencia de la dieta en el efecto del polimorfismo <i>MspI</i> -75 de <i>APOAI</i> sobre los niveles de lípidos plasmáticos	57
3. Resultados del análisis del polimorfismo <i>MspI</i> situado en la posición 83 del intrón 1 del gen de la apolipoproteína AI	63
3.1. Frecuencias del polimorfismo <i>MspI</i> +83 de <i>APOAI</i>	63

3.2. Influencia del polimorfismo <i>MspI</i> +83 de <i>APOAI</i> sobre los niveles plasmáticos de lípidos	64
3.3. Influencia de la dieta en el efecto del polimorfismo <i>MspI</i> +83 de <i>APOAI</i> sobre los niveles de lípidos plasmáticos	66
4. Resultados del análisis del polimorfismo <i>Taq IB</i> de <i>CETP</i> en el intrón 1 del gen de la proteína transportadora de ésteres de colesterol	66
4.1. Frecuencias del polimorfismo <i>Taq IB</i> de <i>CETP</i>	66
4.2. Influencia del polimorfismo <i>Taq IB</i> de <i>CETP</i> sobre los niveles plasmáticos de lípidos	67
4.3. Influencia del IMC en el efecto del polimorfismo <i>Taq IB</i> de <i>CETP</i> sobre los niveles de lípidos plasmáticos	70
5. Resultados del análisis del polimorfismo <i>PON192</i> en el exón 6 del gen de la paraoxonasa 1 ( <i>PON192</i> )	72
5.1. Frecuencias del polimorfismo <i>PON192</i> de <i>PON1</i>	72
5.2. Influencia del polimorfismo <i>PON192</i> de <i>PON1</i> sobre los niveles plasmáticos de lípidos	73
6. Resultados del análisis del polimorfismo <i>PON55</i> en el exón 3 del gen de la paraoxonasa 1 ( <i>PON55</i> )	75
6.1. Frecuencias del polimorfismo <i>PON55</i> de <i>PON1</i>	75
6.2. Influencia del polimorfismo <i>PON55</i> de <i>PON1</i> sobre los niveles plasmáticos de lípidos	76
7. Resultados del análisis del polimorfismo <i>R219K</i> en el exón 7 del gen que codifica el transportador ABCA1	78
7.1. Frecuencias del polimorfismo <i>R219K</i> de <i>ABCA1</i>	78
7.2. Influencia del polimorfismo <i>R219K</i> de <i>ABCA1</i> sobre los niveles	

plasmáticos de lípidos	79
8. Resultados del análisis del polimorfismo <i>V771M</i> en el exón 7 del gen que codifica el transportador ABCA1	81
8.1. Frecuencias del polimorfismo <i>V771M de ABCA1</i>	81
8.2. Influencia del polimorfismo <i>V771M de ABCA1</i> sobre los niveles plasmáticos de lípidos	82
8.3. Influencia del IMC y la DHEA-S sobre la relación de los polimorfismos R219K y V771M d ABCA1 con los niveles de lípidos plasmáticos	84
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>107</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>110</b>

## *INTRODUCCIÓN*

## **1. NIVELES DE COLESTEROL HDL Y RIESGO CARDIOVASCULAR**

Los niveles alterados de lípidos son un factor de riesgo principal en el desarrollo de enfermedad cardiovascular (EC) <sup>1</sup>. La importancia de los niveles plasmáticos de colesterol total (CT) y de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) como factores de riesgo, se ha constatado en múltiples estudios epidemiológicos <sup>2 3 4</sup>. Así el Estudio Siete Países, estudio prospectivo multinacional realizado en 11.579 varones de 40 a 59 años sin antecedentes de EC y pertenecientes a siete países diferentes (Yugoslavia, Grecia, Italia, Holanda, Finlandia, Japón y EEUU) <sup>5</sup>, comprobó como la baja mortalidad por cardiopatía isquémica (CI) en las poblaciones japonesa y mediterránea respecto a la de EEUU, Norte y Centroeuropa estaba relacionada con cifras menores de CT <sup>6</sup>. Asimismo estudios de intervención como el Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) <sup>7</sup>, el Estudio 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study) <sup>8</sup> o el LIPID (The Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease Study) <sup>9</sup> han contribuido también a demostrar la relación directa de los niveles de CT con la incidencia de EC.

En las últimas décadas numerosos estudios han descrito la relación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) con la aterosclerosis, demostrándose que el colesterol transportado en estas lipoproteínas se relaciona de forma inversa con el riesgo cardiovascular, especialmente con la enfermedad coronaria prematura <sup>10</sup>. Tanto el Estudio Framingham en Estados Unidos <sup>11</sup> como el PROCAM en Europa <sup>12</sup> demostraron que niveles de colesterol HDL (C-HDL) bajos son el mejor marcador lipídico de riesgo cardiovascular en poblaciones occidentales. En otros estudios como el Lipid Research Clinics Program (LCR-CPPT) <sup>13 14</sup>, o el MRFIT

<sup>15</sup> se demostró como los niveles altos de C-HDL son protectores frente a la CI, independientemente de los niveles de CT. El impacto de los niveles séricos de C-HDL sobre la CI sería tan importante como el de las cifras de C-LDL; si con una disminución del C-LDL de 10 mg/dl se reduce la incidencia coronaria en un 9%, cuando conseguimos una elevación del C-HDL también de 10 mg/dl, la reducción es del 21% <sup>16</sup>. Estudios como el realizado por Gotto et al <sup>17</sup> en 2004 demuestran que un aumento del 1% de los niveles de C-HDL en suero podría suponer la reducción del riesgo cardiovascular en un 2 ó 3%.

En el contexto de la importancia de los niveles de C-HDL en la protección frente a la EC se ha descrito que deficiencias de apolipoproteína AI (Apo AI), estructuralmente crucial para las partículas HDL, se asocian con alteraciones del metabolismo lipídico que resultan en niveles plasmáticos de colesterol HDL disminuidos y pueden contribuir al desarrollo de aterosclerosis <sup>18 19</sup>.

Asimismo los niveles plasmáticos de C-HDL se han relacionado de forma inversa con los niveles de triglicéridos (TG) <sup>20 21</sup>, no obstante se sabe que cada uno de ellos constituye un factor de riesgo cardiovascular independiente <sup>22 23</sup>. En esta línea Jara et al <sup>24</sup> sugieren que la hipertrigliceridemia podría ser un factor de riesgo coronario añadido con un valor estadístico por lo menos similar al del colesterol.

En base a todas estas evidencias se ha establecido que el C-HDL juega un papel decisivo como factor de riesgo de la aterosclerosis y por ello uno de los objetivos en la prevención de la CI sería alcanzar las concentraciones de C-HDL óptimas <sup>16</sup>. En este sentido el estudio de los factores determinantes del C-HDL en una población adquiere singular importancia.

### **1.1. Niveles de C-HDL en la infancia y riesgo cardiovascular en el adulto**

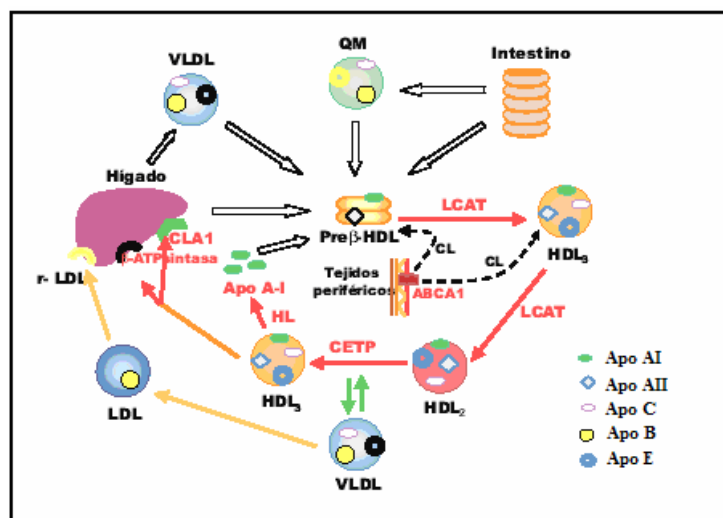
Numerosos estudios han puesto de manifiesto la relación de los niveles de lípidos que presentan los niños con los niveles que más tarde presentaran en la edad adulta <sup>25 26</sup>. En particular sabemos que los niveles de C-HDL en las primeras décadas de la vida correlacionan con los niveles de C-HDL en la edad adulta <sup>27</sup>. En España Sánchez-Bayle et al observaron que más del 70% de los niños que se encontraban en el quintil más alto para los niveles de C-HDL, así como para los niveles de apolipoproteína AI (Apo AI) permanecían en el quintil más alto 5 años después <sup>28</sup>.

En este sentido Dwyer et al analizaron los niveles de C-HDL en la infancia en relación a la incidencia de EC en el adulto en países con diferente tasa de mortalidad por EC como Japón, EEUU y Australia. En el caso de Japón que presenta una tasa de mortalidad cardiovascular baja los niños presentaron niveles de C-HDL elevados, por el contrario en EEUU y Australia con una tasa de mortalidad cardiovascular muy superior a la de Japón, los niños presentaban niveles de C-HDL mucho menores <sup>29</sup>. En este aspecto el Prof. de Oya comparando los elevados niveles de C-HDL observados en los niños españoles del estudio NICAM con lo observados en población infantil estadounidense hace referencia a la posible relación de esos elevados niveles de C-HDL con la menor mortalidad cardiovascular observada en España en comparación con la estadounidense <sup>30</sup>. Al analizar la evolución de los niveles de C-HDL en niños españoles se han descrito niveles de C-HDL muy altos y estables en el tiempo respecto a los observados en otras poblaciones <sup>31</sup>.

## 2. METABOLISMO DE LAS HDL. TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL.

El papel ateroprotector de las HDL se debe principalmente a su implicación en el transporte reverso de colesterol (TRC), mecanismo definido por primera vez en 1968 por Glomset <sup>32</sup> y al que posteriormente en 1973 Glomset y Ross <sup>33</sup> le atribuyeron efecto ateroprotector. El TRC constituye el mecanismo clave para eliminar el exceso de colesterol por vía hepática participando activamente en el eflujo de colesterol celular <sup>34</sup>. Las HDL presentan además propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas que ponen de manifiesto el importante papel fisiológico de estas lipoproteínas y su carácter ateroprotector <sup>35 36</sup>.

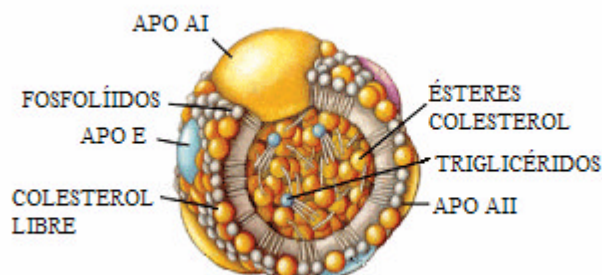
El metabolismo de las HDL (Figura 1) <sup>37</sup> es un proceso extremadamente complejo, en el que estas partículas realizan un intercambio continuo y dinámico de sus componentes con el resto de las lipoproteínas plasmáticas, y en el que intervienen un gran número de apolipoproteínas, receptores, transportadores y enzimas diferentes <sup>38 34</sup>.



**Figura 1.** Esquema del metabolismo del colesterol HDL <sup>37</sup>.



Las lipoproteínas de alta densidad son complejos molecularmente compuestos por un 50% de proteína, principalmente Apo AI y apolipoproteína AII (Apo AII), y en menor medida apolipoproteína E (Apo E) y aproximadamente un 50% de lípidos (Figura 2) <sup>39 40</sup>.



**Figura 2.** Estructura esquematizada de una partícula HDL.

La Apo AI es el componente proteico mayoritario de las HDL y su papel es fundamental en el metabolismo de estas lipoproteínas, ya que está presente en todos los tipos de partículas HDL, siendo el principal determinante del tamaño de las mismas y de su maduración <sup>41</sup>. Esta apolipoproteína se sintetiza en el hígado y en la mucosa intestinal en forma de pre-pro-Apo AI, que será transformada en pro-Apo AI primero y posteriormente en el plasma en Apo AI madura <sup>42</sup>. Es secretada como una molécula pobre en lípidos que irá adquiriendo fosfolípidos (FL) y colesterol a través, tanto del flujo de colesterol celular como de quilomicrones (QM) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) <sup>43</sup>, actuando como un mediador esencial en el flujo de colesterol celular y el transporte reverso del mismo ya que forma parte del llamado *complejo de transferencia de ésteres de colesterol*, constituye el principal activador de la lecitin: colesterol aciltransferasa (LCAT) <sup>44 45 46</sup> y actúa de ligando del receptor SR-BI (receptor Scavenger BI) de la partícula HDL implicado en el TRC <sup>47</sup>.

La apolipoproteína AII es el segundo componente proteico de las partículas HDL (constituye aproximadamente el 20%), y su síntesis se lleva a cabo principalmente en hígado y en intestino <sup>48</sup>, en forma de pre-pro-apo AII que posteriormente será transformada en pro-Apo AII y finalmente en Apo AII madura en el plasma <sup>49</sup>. A pesar de atribuirle un papel antiaterogénico su función fisiológica no está del todo clara <sup>50</sup>. Se piensa que participa en el TRC desde células periféricas al hígado, modulando la actividad de las enzimas LCAT <sup>45</sup>, lipasa hepática (LH) <sup>51</sup> y de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) <sup>52</sup>.

La apolipoproteína E se conoce desde 1973 <sup>53</sup>. Es una proteína sintetizada por el hígado que forma parte de QM, VLDL y HDL, y cuya principal función es actuar de ligando de los receptores hepáticos para favorecer la eliminación de lípidos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (QM y VLDL) <sup>54 55</sup>, así como participar en la regulación de la producción de VLDL por parte del hígado y la lipólisis de esas VLDL por parte de la lipoproteína lipasa (LPL) <sup>56</sup>, lo que la convierte en un importante regulador del metabolismo de las lipoproteínas que participa en la modulación de los niveles de lípidos <sup>57</sup>. Se ha demostrado que niveles altos de Apo E se relacionan con aumento de la eliminación de lípidos de las lipoproteínas y en consecuencia con una disminución de los niveles plasmáticos de lípidos. No obstante también se ha descrito que un excesivo incremento de los niveles de Apo E inhibe la lipólisis de las VLDL con el consiguiente acúmulo de las mismas y de los TG y que además, puede estimular la producción de TG por parte de las VLDL, aumentando los niveles de estas lipoproteínas en el plasma <sup>58</sup>.

En los primeros pasos del transporte reverso de colesterol el hígado y el intestino segregan lipoproteínas de alta densidad de pequeño tamaño, relativamente ricas en proteínas y fosfolípidos (FL) y prácticamente sin colesterol<sup>59</sup>. Estas HDL recogen el colesterol procedente de las células mediante dos vías <sup>60</sup>:

- Por difusión del colesterol de la membrana celular al medio, estimulado por un gradiente de colesterol libre hacia la partícula HDL, que se consigue por la esterificación de la molécula por acción de la LCAT, enzima asociada a las HDL que es activada por la Apo AI.

- Por interacción de la Apo AI o de la misma partícula HDL con la superficie celular, que activa la translocación de colesterol intracelular a la membrana y posteriormente su incorporación a la partícula HDL.

Se han descrito dos proteínas que tienen un papel fundamental en el paso de colesterol desde la membrana celular a las partículas HDL: El receptor CLA-1/SR-BI, que interacciona con las HDL <sup>61</sup> y facilita la transferencia de colesterol a estas partículas y la proteína transportadora ABCA1 (ATP-binding cassette A1), que media el mecanismo más eficiente para la extracción de colesterol <sup>62</sup>. Esta familia recibe el nombre de transportadores ABC debido a una parte de su estructura, las secuencias ABC, gracias a las cuáles utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para realizar el transporte activo de diferentes sustratos a través de la membrana celular y participar en varios puntos clave de la homeostasis de colesterol <sup>63 64</sup>. La subfamilia ABCA1 fue descubierta estudiando la enfermedad de Tangier, demostrándose así su papel en la formación de la HDL, el TRC y las posibles diferencias que podrían existir en función de las variantes descritas para este gen <sup>65 66</sup>. En el año 2003 Basso et al demostraron que el

transportador ABCA1 hepático es una proteína clave para la formación y el mantenimiento de los niveles de C-HDL en el plasma <sup>67</sup>, ya que media el primer paso de la eliminación del colesterol por medio del transporte reverso del mismo: transferencia de FL y colesterol a las lipoproteínas pobres en lípidos <sup>62</sup>.

En definitiva las partículas que captan el colesterol celular procedente de la membrana plasmática, ya sea a través de receptor CLA-1/SR-BI o del transportador ABCA1, son las pre- $\beta_1$ -HDL, pequeñas y ricas en Apo AI y FL o las Apo AI pobres en lípidos. Mediante la incorporación de los lípidos celulares dan origen a partículas discoidales de mayor tamaño denominadas pre- $\beta_2$ -HDL y pre- $\beta_3$ -HDL <sup>68</sup>. El colesterol libre de estas HDL es esterificado por la LCAT y así estas partículas van aumentando de tamaño según incorporan colesterol celular y adquieren forma esférica dando lugar a las HDL<sub>3</sub>. Estas partículas HDL<sub>3</sub> son heterogéneas y contienen Apo AI, Apo C y Apo AII <sup>69</sup> y pueden seguir recogiendo colesterol y FL de las células así como incorporar lípidos y apolipoproteínas procedentes de las lipoproteínas que contiene apolipoproteína B (Apo B) (VLDL y LDL), por acción de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), que participa en la transferencia de FL <sup>70</sup>.

De esta forma la partícula HDL sigue aumentando de tamaño dando lugar a las HDL<sub>2</sub>, sobre las que actúa la CETP facilitando la cesión de los ésteres de colesterol a las VLDL y a las LDL, que a su vez los ceden a los tejidos, principalmente al hígado <sup>71</sup>. La CETP es una glicoproteína con carácter hidrofóbico que se produce en el hígado y tejido adiposo principalmente y se encuentra en el plasma unida a las lipoproteínas <sup>72</sup>. Su estructura permite a esta proteína unir dos moléculas de lípidos neutros (ésteres de colesterol y/o TG) y dos FL <sup>73</sup> para promover su redistribución entre las partículas HDL y las partículas

LDL, IDL, VLDL y QM. Desarrollando así un papel clave en el metabolismo del C-HDL, al encargarse de regular sus niveles plasmáticos y de la remodelación de partículas HDL a través de la disminución de su contenido en ésteres de colesterol y su enriquecimiento en TG, con la consiguiente reducción del tamaño de la partícula HDL <sup>74 43</sup>. En los años noventa, Inazu et al <sup>75</sup> e Ikewaki et al <sup>76</sup> demostraron en población japonesa la importancia de la CETP en el metabolismo del colesterol HDL al observar un aumento de los niveles de C-HDL y Apo AI en pacientes con deficiencia de CETP .

Por otro lado las HDL pueden ceder directamente el colesterol a los tejidos, bien por endocitosis de las partículas a través del r-LDL (receptor de las lipoproteínas de baja densidad) o del LRP (receptor relacionado con r-LDL), bien por interacción con el receptor CLA-1/SRBI y cesión de los ésteres de colesterol y colesterol libre de forma directa, produciéndose así una HDL más pobre en colesterol y de menor tamaño (HDL<sub>3</sub>) capaz de captar más colesterol <sup>47</sup>.

Finalmente en un último paso los FL de las partículas HDL son hidrolizados por la LH endotelial y los TG por acción de la LPL y en menor medida también por la LH endotelial. Como consecuencia se transforman las HDL<sub>2</sub> en HDL<sub>3</sub>, y se produce la disociación de parte de la Apo AI que se reconstituye como aceptor de colesterol celular, reiniciándose así el ciclo de transporte de colesterol <sup>59</sup>.

En resumen los niveles plasmáticos, tamaño y contenido lipídico de las partículas HDL están determinados, principalmente, por la fracción de Apo AI y Apo AII catabolizada <sup>77</sup>, la CETP <sup>75</sup> y las enzimas LCAT <sup>78</sup>, LPL <sup>79</sup> y LH <sup>80</sup>, así como por la proteína transportadora ABCA1 <sup>81</sup>. En los últimos años nuevas proteínas han adquirido importancia en relación al C-HDL, es el caso de la

apolipoproteína AV (Apo AV). Esta apolipoproteína es sintetizada en el plasma y se expresa en hígado, encontrándose siempre asociada a QM, VLDL y HDL y presentando niveles plasmáticos muy bajos respecto a otras apolipoproteínas <sup>82</sup>. Hasta la fecha se han descrito tres mecanismos de acción de la Apo AV que demuestran su participación en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas: Inhibición de la formación de VLDL, estimulación de la LPL mediada por la hidrólisis de triacilglicerol, y estimulación de la captación hepática de lipoproteínas ricas en triglicéridos y sus remanentes <sup>83</sup>. Se ha demostrado una asociación indirecta entre la Apo AV y los TG a través del metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG <sup>84</sup>. Considerando esta asociación y dado que los niveles de TG se han constituido como un factor independiente en el desarrollo de aterosclerosis, se ha sugerido que variantes genéticas de la Apo AV podrían estar relacionadas con esta enfermedad <sup>85</sup>.

Asimismo se ha hecho referencia a la participación de la proteína paraoxonasa 1 (PON1) en el metabolismo de las HDL <sup>86 87</sup>. La actividad antioxidante de PON1 constituye un mecanismo antiaterogénico <sup>43</sup>, fundamentalmente por su capacidad de proteger a las partículas HDL del daño oxidativo <sup>88</sup> permitiendo así que sigan desempeñando su papel como aceptor de colesterol celular <sup>89</sup>. No obstante es importante tener en cuenta que la actividad enzimática paraoxonasa está restringida a determinadas subfracciones de HDL y que necesita la apolipoproteína AI para su estabilidad <sup>90 91</sup>.

### 3. ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LAS HDL

Existen trastornos que afectan al metabolismo del colesterol HDL alterando la composición, concentración y tamaño de éstas partículas y que cursan bien con niveles bajos de C-HDL, como es el caso de las hipoalfalipoproteinemias, bien con cifras elevadas de C-HDL como en las hiperalfalipoproteinemias <sup>92</sup>.

Las hipo e hiperalfalipoproteinemias pueden ser primarias, cuando la causa es de origen genético, o secundarias cuando es consecuencia de factores adquiridos o externos. Dentro de las hipoalfalipoproteinemias primarias está la enfermedad de Tangier (ET) y la hipoalfalipoproteinemia familiar (HF). La ET se caracteriza por deficiencia casi completa de C-HDL y bajos niveles de CT, C-LDL, Apo AI y Apo B y concentraciones elevadas de TG y es causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína ABCA1 <sup>65</sup>, asociándose con riesgo de enfermedad coronaria prematura seis veces mayor respecto a la población general <sup>93</sup>. La HF también se asocia con riesgo aumentado de enfermedad coronaria prematura y se caracteriza por concentraciones de C-HDL un 50% por debajo de las normales, así como equivalentes descensos de Apo AI y CT, y en ocasiones de TG <sup>94</sup>.

Se han descrito un gran número de polimorfismos que se relacionan con niveles alterados de Apo AI <sup>95 96 18 97 98</sup>. Es el caso de la deficiencia familiar de Apo AI, que se caracteriza por concentraciones nulas de esta apolipoproteína y niveles de C-HDL extremadamente bajos en los homocigotos y concentraciones cercanas al 50% de las concentraciones normales en los heterocigotos <sup>19</sup>, o de la variante *APOAI Milano* <sup>99</sup> descrita en el norte de Italia. Esta variante se

caracteriza por concentraciones de C-HDL entorno a 20 mg/dL y catabolismo de estas lipoproteínas aumentado, sin embargo no presenta alteraciones clínicas relevantes y curiosamente se ha asociado con protección frente a la aterosclerosis ya que promueve el eflujo de colesterol celular.

La hiperalfalipoproteinemia se ha definido como un aumento considerable de la concentración de C-HDL <sup>100</sup>, situada por encima de 60 mg/dL en las mujeres y 70-75 mg/dL en los hombres. El perfil lipídico de esta enfermedad se caracteriza por concentraciones elevadas de HDL<sub>2</sub>, aumento de Apo AI y en general niveles estables de C-LDL y Apo B, no obstante no se han descrito manifestaciones clínicas asociadas al fenotipo de esta alteración. El aumento de C-HDL puede ser debido a un incremento de su síntesis, a un descenso del catabolismo de estas partículas, o a una combinación de ambos debida a causas genéticas o ambientales. Entre las deficiencias más importantes que pueden dar lugar a hiperalfalipoproteinemias se encuentran la hiperproducción familiar de Apo AI, la deficiencia familiar de LH y la deficiencia familiar de CETP <sup>101</sup>.

#### **4. FACTORES DETERMINANTES DEL COLESTEROL HDL**

Aunque se ha demostrado que los factores genéticos son un factor principal en la determinación del C-HDL <sup>102 103</sup>, se sabe que otros factores como el sexo, la raza, las hormonas sexuales, la dieta, el alcohol, el tabaco, el IMC (Índice de Masa Corporal) o el ejercicio físico influyen en los niveles plasmáticos del C-HDL llegando a determinar un importante porcentaje de la variación de estos niveles <sup>104</sup>.



Existen numerosos estudios que corroboran la influencia de estos factores en el C-HDL: Criqui et al <sup>105</sup> en resultados del Lipid Research Clinics Follow-up Study evidencian la influencia del alcohol y el hábito tabáquico, Durstine et al <sup>106</sup> el beneficio del ejercicio físico moderado, Berns et al <sup>107</sup> la relación negativa con un IMC elevado y Grundy et al <sup>108</sup> la influencia de la ingesta de grasa en los niveles plasmáticos de C-HDL. A su vez, en España el estudio REGICOR observa que los sujetos con un elevado IMC presentan niveles de C-HDL más bajos. Además en este estudio, en el caso de las mujeres la prevalencia de fumadoras fue significativamente más baja en el grupo con niveles de C-HDL más altos, y en los hombres se asoció el consumo de alcohol y una elevada tasa de ejercicio físico con elevados niveles de C-HDL <sup>109</sup>.

La importante influencia genética en los niveles plasmáticos de C-HDL se conoce desde los años ochenta <sup>110</sup>. Estudios familiares demostraron que existe un fuerte carácter hereditario en la variabilidad de los niveles de C-HDL <sup>102</sup>, estableciendo la heredabilidad de estos niveles de C-HDL entorno al 50% <sup>111 104</sup>. En este sentido en familias hipercolesterolémicas se ha demostrado que polimorfismos en genes del metabolismo del C-HDL contribuyen a explicar sus concentraciones plasmáticas en aproximadamente un 32% <sup>112</sup>. Desde entonces y de acuerdo con la teoría del gen candidato <sup>113</sup>, numerosos genes implicados en el metabolismo de estas lipoproteínas y sus variantes funcionales han sido relacionados con los niveles plasmáticos de C-HDL. Son los genes de las apolipoproteínas, enzimas y proteínas transportadoras asociadas a las HDL, enzimas plasmáticas y celulares, factores de transcripción, receptores celulares.... <sup>114 115 116</sup> que, como se ha comentado anteriormente presentan un papel fundamental en el metabolismo de las HDL. A pesar de que hasta el momento

desconocemos la totalidad de los genes implicados en la variabilidad poblacional de los niveles de C-HDL <sup>117</sup>, se ha observado que algunos de estos genes y sus polimorfismos se asocian de forma más consistente con variabilidad del C-HDL adquiriendo importancia y permaneciendo en los últimos años como genes claramente candidatos en el estudio del metabolismo de estas lipoproteínas. En una revisión reciente se incluyen las variantes genéticas de la Apo AI, la CETP, la proteína antioxidante PON1 y el transportador ABCA1, entre otros, como claros determinantes genéticos de los niveles de C-HDL (Tabla 1) <sup>112</sup>.

<b>DETERMINANTES GENÉTICOS DEL C-HDL</b>
<b>APOLIPOPROTEÍNAS</b>
Apolipoproteína AI
Apolipoproteína AII
Apolipoproteína E
Apolipoproteína AV
<b>ENZIMAS Y PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA</b>
CETP (Proteína transportadora de ésteres de colesterol)
LCAT (Lecitin-colesterol aciltransferasa)
PON1 (Paraoxonasa 1)
<b>PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS</b>
Transportador ABCA1
<b>ENZIMAS PLASMÁTICAS Y CELULARES</b>
Lipasa Hepática
<b>FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN</b>
PPAR $\alpha$

**Tabla 1.** Genes candidatos del metabolismo del C-HDL.

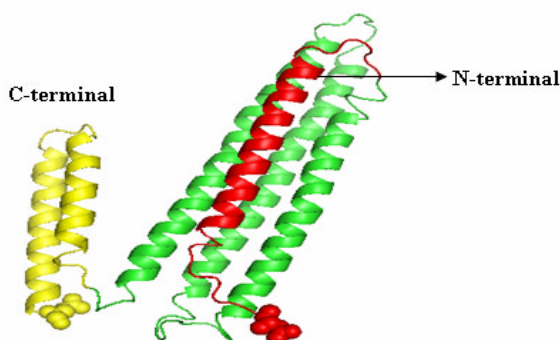
(de acuerdo con la revisión de Sviridov et al Curr Opin Lipidol 2007; 18: 157-63) <sup>112</sup>.

## 5. ALTERACIONES GENÉTICAS DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS

### 5.1. Apolipoproteína AI

Como se ha comentado anteriormente la Apo AI es el componente mayoritario de las lipoproteínas de alta densidad y está presente en todos los tipos de partículas HDL, siendo el principal determinante del tamaño de las mismas y de su maduración <sup>41</sup>.

La molécula de apolipoproteína AI existe en múltiples conformaciones según esté libre de lípidos, parcial o completamente unida a ellos <sup>118</sup>. Ajees et al han propuesto recientemente un modelo de la estructura de Apo AI cuando está libre de lípidos (Figura 3). La molécula consiste en dos dominios helicoidales, el primero de ellos formado por cuatro hélices antiparalelas formadas por el extremo N-terminal de la molécula y el segundo por dos hélices formadas por el extremo C-terminal, que presenta gran afinidad por los lípidos. En la base del dominio de las cuatro hélices se localizaría una zona hidrofóbica accesible a los lípidos <sup>119</sup>.



**Figura 3.** Estructura apolipoproteína AI libre de lípidos <sup>119</sup>.

El gen de la Apo AI está agrupado con el de la apolipoproteína C-III y la apolipoproteína A IV y se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q23-q24) <sup>120</sup>. Mutaciones en el gen de la Apo AI se han relacionado con niveles

disminuidos de C-HDL y en consecuencia con aumento de riesgo de aterosclerosis <sup>121 18 122</sup>.

Se han identificado numerosos RFLPs (restriction fragment length polymorphism) en el gen de Apo AI. Los más frecuentemente descritos se localizan en <sup>123</sup>:

- la región flanqueante 5', donde se sitúa una diana de restricción para la enzima XmnI
- en la región del promotor, donde la enzima de restricción MspI reconoce un sitio de corte localizado en la posición -75pb
- en el intrón 1 donde la enzima MspI presenta al menos un sitio de restricción (en la posición 83pb)
- en el intrón 2, donde se localiza un sitio de restricción para la enzima HaeIII.

El polimorfismo *MspI* -75 se localiza en la región promotora del gen *APOAI*, 75 pares de bases arriba del sitio de inicio de la transcripción. Esta mutación supone un cambio de base de guanina por adenina que se ha relacionado con incremento de los niveles de Apo AI <sup>124</sup>.

El polimorfismo *MspI* +83 se localiza en el intrón 1 del gen de *APOAI*, 83 pares de bases después del sitio de inicio de la transcripción. En este caso se produce un cambio de citosina por timina. La relación de esta variante genética con los niveles de lípidos es controvertida, ya que aunque hay estudios que la han relacionado con niveles de C-HDL elevados <sup>125</sup>, otros estudios no han encontrado dicha asociación <sup>126</sup>.

En ambos casos se ha observado una modulación de dicha influencia en función del tipo de dieta, poniendo de manifiesto una interacción gen-ambiente en el efecto que estas variantes genéticas de *APOAI* tienen sobre el perfil lipídico <sup>127</sup>  
<sup>128</sup>.

## 5.2. Apolipoproteína AII

La Apo AII es la segunda proteína más abundante de las HDL, sin embargo su papel biológico aún no está del todo claro <sup>50</sup>. El gen de esta apolipoproteína se localiza en el cromosoma 1 <sup>129</sup>. Se han descrito varios polimorfismos en este gen: *APOAII Hiroshima*, que se localiza en el tercer intrón y se asocia en homocigosis con deficiencia de Apo AII <sup>130</sup>, una transición Timina-Citosina en posición 265 que se ha relacionado con variaciones de los niveles plasmáticos de Apo AII <sup>131</sup>, tres mutaciones localizadas en el codón stop, que dan lugar a una extensión C-terminal en la proteína <sup>132</sup> y finalmente uno de los polimorfismos de Apo AII más estudiados, situado en la región 3' del gen, que presenta una diana de restricción para MspI. Este último polimorfismo presenta una relación controvertida con niveles de C-HDL, Apo AII y TG en plasma, ya que si bien algunos autores han encontrado dicha asociación <sup>133 134</sup>, en numerosos estudios no se ha descrito asociación alguna de este polimorfismo con niveles plasmáticos de C-HDL, Apo AII y TG <sup>135 136 137 138</sup>.

## 5.3. Apolipoproteína E

El gen de la Apo E se localiza en el cromosoma 19 (19q13.2), agrupado con los genes de las apolipoproteínas CI, CII y CIV, y comprende cuatro exones y tres intrones <sup>139</sup>. Se trata de un gen polimórfico con tres alelos codominantes ( $\epsilon$ 2,

$\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ), que dan lugar a seis posibles genotipos:  $\epsilon 2\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3\epsilon 4$ ,  $\epsilon 4\epsilon 4$ . Las tres isoformas que se originan a partir de los tres alelos se diferencian entre sí en 1 ó 2 aminoácidos <sup>140</sup>.

Los polimorfismos del gen de la Apo E que se localizan en el exón 4 consisten en diferencia de una base en posición 112 y/o 158 (cambio de una citosina por una timina), que supone un cambio de Arginina por Cisteína. La isoforma E2 tiene una Cisteína en posición 112 y 158, E3 tiene Cisteína en posición 112 y Arginina en posición 158 y E4 tiene una Arginina en ambas posiciones, 112 y 158 <sup>141</sup>.

Estudios llevados a cabo en población adulta han demostrado la relación del alelo  $\epsilon 4$  con niveles más altos de CT y C-LDL, con el consiguiente aumento del riesgo cardiovascular, respecto a los portadores del alelo  $\epsilon 3$ , que a su vez presentaban niveles más altos que los individuos portadores del alelo  $\epsilon 2$  <sup>142 143 144</sup>. La influencia del genotipo de Apo E sobre los niveles de C-HDL todavía no se conoce de forma clara <sup>145</sup>, sin embargo existen indicios de asociación entre el alelo  $\epsilon 4$  y niveles disminuidos de C-HDL <sup>146 147</sup> y entre el alelo  $\epsilon 2$  y niveles de C-HDL elevados <sup>148 149 150</sup>.

#### 5.4. Apolipoproteína AV

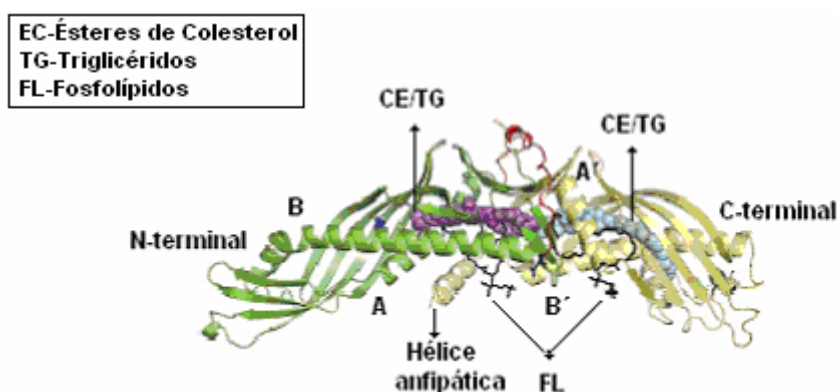
El gen de la Apo AV se encuentra en el brazo largo del cromosoma 11, adyacente al cluster Apo AI-CIII-AIV y está formado por cuatro exones <sup>151</sup>. Se han descrito varios SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) en el gen de Apo AV que se han asociado con dislipemia, correlacionando inversamente los niveles de Apo AV con los niveles plasmáticos de TG <sup>152</sup>.

## 6. ALTERACIONES GENÉTICAS EN ENZIMAS Y PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA

### 6.1. Proteína transportadora de ésteres de colesterol

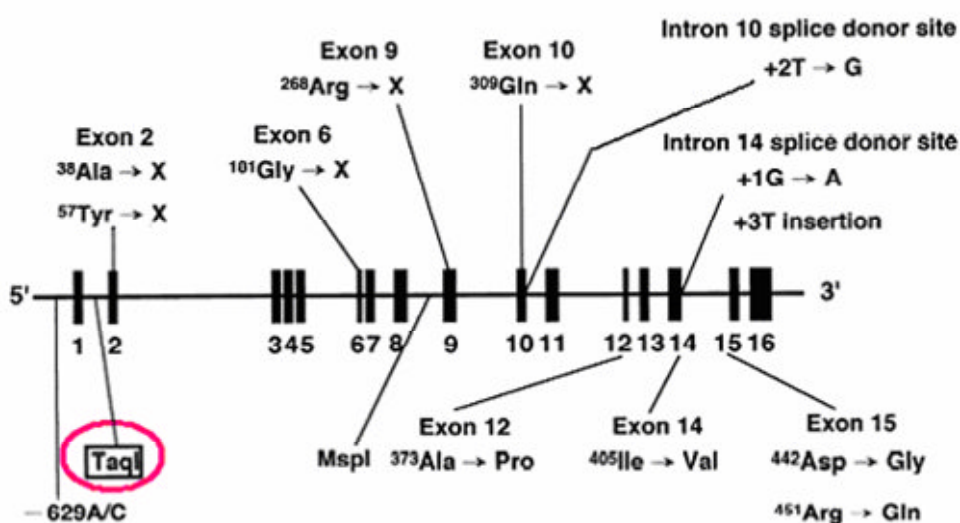
Como ya se ha comentado la proteína transportadora de ésteres de colesterol es fundamental en el metabolismo de las partículas HDL, ya que se encarga de facilitar el paso de ésteres de colesterol desde las partículas HDL<sub>2</sub> a las VLDL y a las LDL para que las partículas HDL puedan seguir captando colesterol<sup>74</sup>.

La CETP está formada por dos dominios similares unidos por un nexo central, presentando así una forma parecida a un “boomerang”. Estructuralmente la proteína se puede dividir en cuatro unidades (Figura 4): dos estructuras con aspecto de barril situadas cada una en un extremo de la proteína (N y C), que contienen una lámina  $\beta$  torsionada y dos hélices (A y B en el “barril” N y A' y B' en el “barril” C), una lámina  $\beta$  formada por seis hebras antiparalelas que se localiza entre las dos estructuras con forma de barril, y una extensión final del dominio C-terminal que contiene una hélice anfipática (Figura 4)<sup>153</sup>.



**Figura 4.** Esquema de la estructura de la proteína CETP<sup>153</sup>.

El gen de la CETP se localiza en el cromosoma 16 (16q12-16q21) y está formado por 16 exones y 15 intrones<sup>154</sup>. Es un gen altamente polimórfico del que se han descrito numerosas variantes genéticas que se muestran esquemáticamente en la Figura 5<sup>155</sup>. El polimorfismo *Taq IB* se localiza en el intrón 1 del gen y es el que se ha asociado de forma más consistente con niveles alterados de C-HDL<sup>156</sup><sup>157</sup>. Se ha descrito que el efecto de esta variante genética es dependiente del sexo y está influido por otros factores como el IMC, el alcohol y el tabaco<sup>158</sup>.



**Figura 5.** Principales mutaciones y polimorfismos descritos en el gen de la CETP<sup>155</sup>.

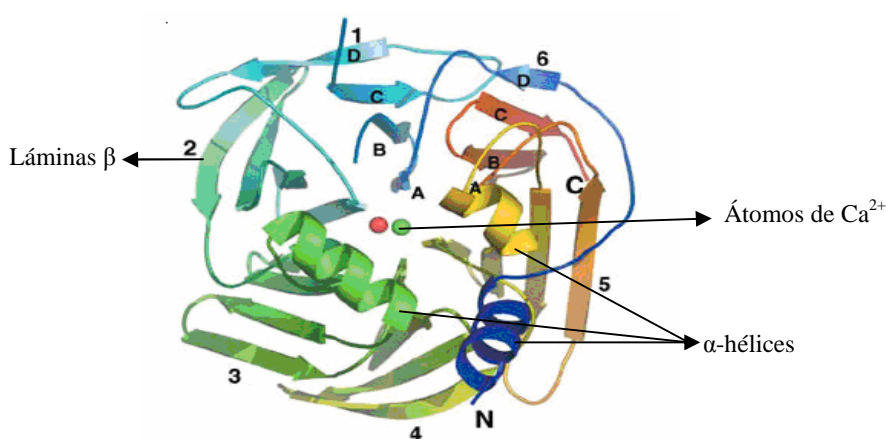
La nomenclatura más comúnmente utilizada para el polimorfismo *Taq IB* es B1B1 para la presencia de dos guaninas (B1 alelo no mutado) y B2B2 para la presencia de dos adeninas (B2 alelo mutado)<sup>159</sup>. En el Estudio Framingham se observó la asociación del alelo B2 de esta variante genética con menor riesgo de EC en hombres<sup>157</sup>, asociación que ha sido confirmada posteriormente por otros estudios<sup>160</sup><sup>161</sup>. Por otro lado trabajos como el publicado por Whiting et al<sup>162</sup> sostienen la relación del genotipo B2B2 del gen de la CETP con los niveles de C-HDL pero no con la EC.



## 6.2. Paraoxonasa 1

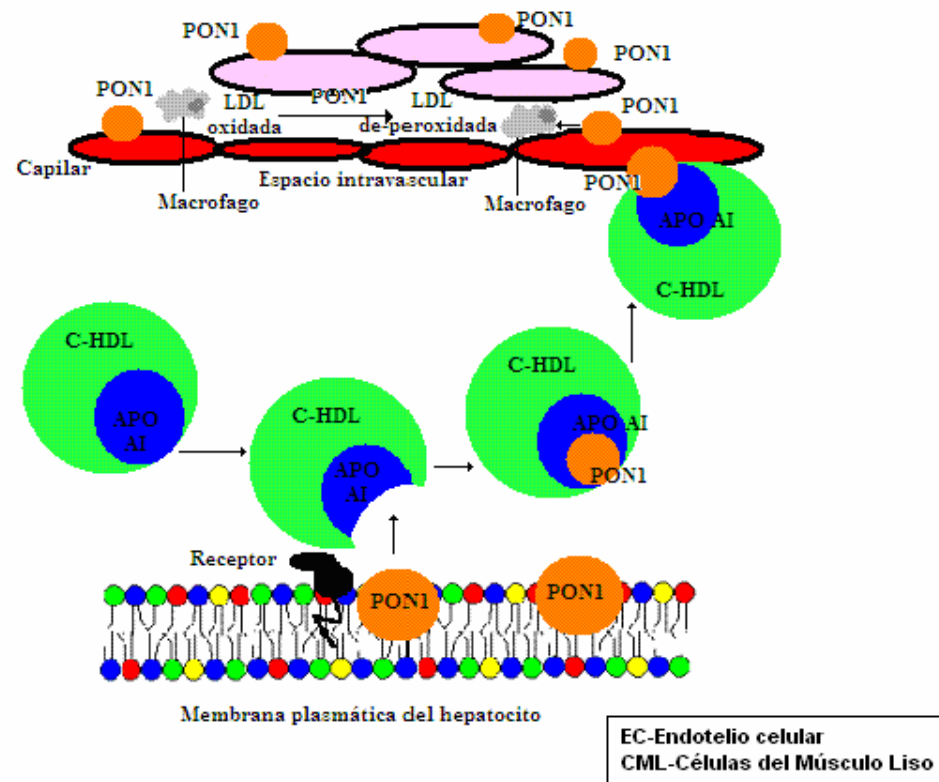
La paraoxonasa 1 es una enzima que, como se ha comentado, participa principalmente en la actividad antioxidante de las partículas HDL <sup>163</sup>.

Estructuralmente la proteína PON1 está formada por seis dominios propulsores de lámina  $\beta$  plegada (numerados del 1 al 6 en la Figura 6), cada uno formado a su vez por cuatro láminas  $\beta$  (nombradas de la A a la D en la figura adjunta), la proteína contiene dos átomos de calcio encargados de estabilizar la estructura y de la actividad catalítica. Por encima de las estructuras propulsoras hay tres  $\alpha$  hélices que participan en el anclaje a las partículas HDL <sup>164</sup>, en la Figura 6 se muestra un esquema de la estructura de la paraoxonasa 1 <sup>164</sup>.



**Figura 6.** Estructura de la paraoxonasa 1 <sup>164</sup>.

PON1 pertenece a la familia de las paraoxonasas séricas, formada por PON1, PON2 y PON3. Los genes que codifican estas proteínas se localizan en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21.3-q22.1) <sup>165</sup>. La enzima PON1 se expresa en riñones, intestino delgado e hígado, y desde éste se libera a la sangre donde se asocia con las partículas HDL <sup>166</sup> (Figura 7, adaptada a partir de un modelo propuesto por Sorenson et al <sup>167</sup>).



**Figura 7.** Modelo de secreción de PON1, asociación con las HDL y transferencia de la enzima a sitios donde se localiza daño vascular <sup>167</sup>.

(adaptada a partir de Sorenson et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2214-25).

Las variantes genéticas de PON1 han sido relacionadas con variaciones en la concentración y actividad de la enzima y con variaciones de los niveles plasmáticos de lípidos en distintas poblaciones <sup>168 169 170</sup>.

En este sentido Hegele et al <sup>171</sup> describió que el polimorfismo *PON192* (Gln-Arg), que determina los alelos *PON1-Q* y *PON1-R* asociados con menor/mayor actividad de la enzima dependiendo del sustrato <sup>172</sup>, se asocia con variaciones en los niveles de C-LDL y Apo B, observándose un menor cociente LDL/HDL en población canadiense.

La variante genética *PON55* (Met-Leu), que determina los alelos *PON1-M* y *PON1-L*, se ha relacionado con modificaciones en las concentraciones séricas

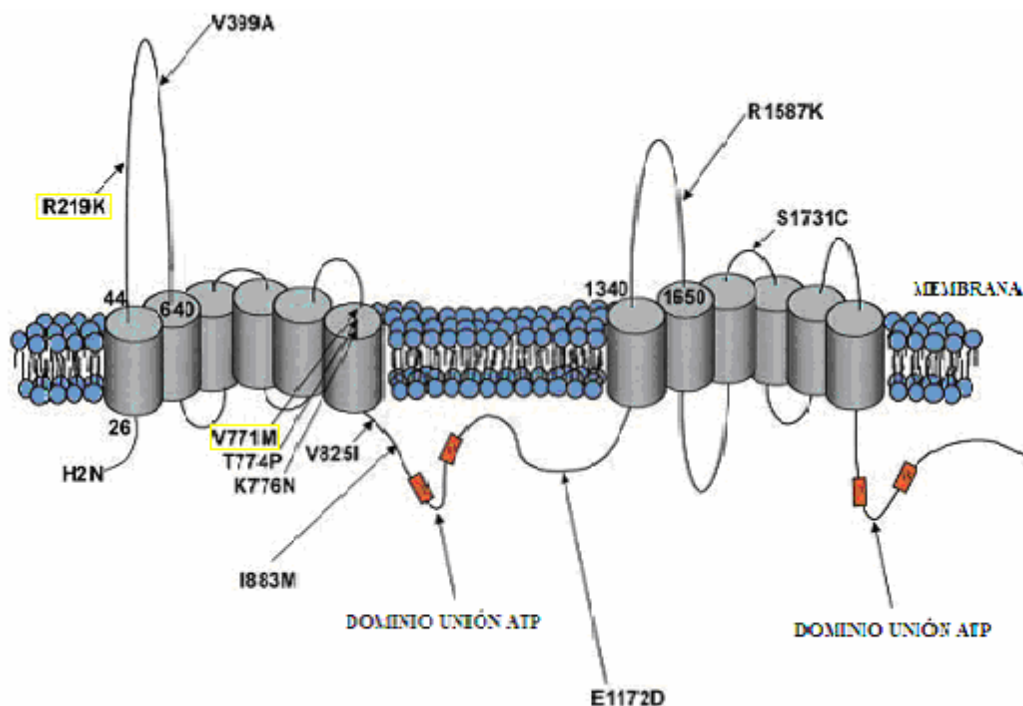
de paraoxonasa 1. Leview et al <sup>173</sup> y Blatter-Garin et al <sup>174</sup> observaron que los portadores del alelo L tenían concentraciones de PON1 significativamente más elevadas que los portadores del alelo M, lo que implicaba diferencias en la actividad de la enzima, sin embargo su relación con los niveles plasmáticos de lípidos no está clara <sup>175 176</sup> aunque autores como Oliveira et al <sup>177</sup> hayan descrito niveles de TG significativamente más bajos en los portadores del genotipo MM, asociándolo a menor riesgo cardiovascular.

## **7. ALTERACIONES GENÉTICAS DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS**

### **7.1. Transportadores ABCA1**

La proteína transportadora ABCA1 es una proteína fundamental en el metabolismo de las HDL, ya que participa en el TRC mediando el mecanismo más eficiente en el eflujo de colesterol celular <sup>67</sup>.

El transportador ABCA1 tiene una estructura muy similar a los otros miembros de la familia ABC. Presenta dos dominios transmembrana formados cada uno de ellos por seis segmentos que atraviesan la membrana conectados entre sí por sucesivos dominios exocitosólicos. Éstos dominios se localizan en una larga cadena polipeptídica que contiene un dominio citoplásmico formado por un gran bucle hidrofóbico que se sospecha tiene función reguladora y se sitúa entre los dos módulos de seis segmentos que permiten la translocación de sustratos (lípidos, aminoácidos, vitaminas, iones...) a través de la membrana. El transportador presenta además dos dominios de unión e hidrólisis de ATP que proporcionan la energía necesaria para el transporte <sup>178</sup>. En la Figura 8 se muestra un esquema simplificado de la estructura de un transportador ABCA1 <sup>37 179</sup>.



**Figura 8:** Esquema de la estructura del transportador ABCA1 y localización de los SNPs descritos en el transportador<sup>179</sup>.

Sin embargo aunque el transportador ABCA1 esté bien caracterizado se conoce muy poco acerca de su estructura cuaternaria. Denis et al han propuesto un modelo en el que la estructura oligomérica de la proteína desempeñaría un papel regulador, y la función de transportador activo de lípidos la llevaría a cabo la estructura dimérica de la misma<sup>180</sup>. Actualmente se sabe que la Apo AI interacciona con el transportador ABCA1 induciendo su fosforilación a través de la vía de la proteína kinasa A dependiente de AMPc y que en las células humanas in vivo el transportador se encuentra en su forma tetramérica en la mayoría de los casos, lo que apoya el concepto de que el complejo homotetramérico del transportador constituye la unidad mínima funcional para la formación de partículas HDL nacientes<sup>46</sup>.

Hasta el momento no se conoce completamente como sucede la interacción entre Apo AI y ABCA1. Algunos autores sostienen la unión proteína-

proteína dando lugar al complejo Apo AI-ABCA1 de forma que ABCA1 actuaría como receptor de membrana de la Apo AI<sup>181 182</sup>, no obstante el papel de receptor del transportador ABCA1 todavía no se ha aceptado de forma generalizada<sup>183</sup>.

El gen que codifica esta proteína se localiza en el cromosoma 9 (9q31)<sup>184</sup>. Actualmente se conoce la existencia de unas 100 mutaciones<sup>185</sup> en este transportador, de las que solo algunas se pueden considerar polimorfismos (aparecen en más del 1% de la población). Se ha descrito la existencia de 19 SNPs, cinco en la región promotora, cuatro variantes en 5' UTR y los diez restantes son cSNPs (Tabla 2)<sup>186</sup>. En la Figura 8<sup>186</sup> se muestra la localización de estos polimorfismos en la proteína.

NUCLEÓTIDO	AMINOÁCIDO	EXÓN
-1095A/G	Promotor	....
-477C/T	Promotor	....
-419 <sup>a</sup> /C	Promotor	....
-320G/C	Promotor	....
-191G/C	Promotor	....
C69T	5'UTR	1
C117G	5'UTR	1
InsG319	5'UTR	2
G378C	5'UTR	2
G1051A	R219K	7
T1591C	V399A	11
G2706A	V771M	16
A2715C	T774P	16
G2723C	K776N	16
G2826A	V825I	17
A3044G	I883M	18
G3911C	E1172D	24
G5255A	R1587K	35
C5587G	S1731C	38

**Tabla 2.** SNPs descritos en el gen *ABCA1*<sup>186</sup>.

Algunas de estas mutaciones han sido asociadas con alteraciones de los niveles plasmáticos de lípidos y más concretamente con los niveles de C-HDL. Se ha observado que individuos heterocigotos para mutaciones en el gen *ABCA1*

tienen niveles de C-HDL disminuidos y aumentados de TG y presentan mayor severidad de la enfermedad coronaria<sup>185 179</sup>.

Tras la asociación de esta proteína con la enfermedad de Tangier<sup>65</sup>, se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de conocer la existencia de variantes genéticas del gen *ABCA1* que sean funcionalmente significativas y puedan contribuir a la variación de los niveles de C-HDL y desarrollo de aterosclerosis<sup>187 179</sup>. En este sentido se ha sugerido que *ABCA1* pudiese ser un locus principal para la susceptibilidad frente a la aterosclerosis en la población general, ya que se ha demostrado que seis de los 10 cSNPs descritos en la Tabla 2 se asocian con niveles alterados de lípidos y aterosclerosis. En concreto los polimorfismos *R219K* y *V771M* se han relacionado consistentemente con aumento de C-HDL y descenso de TG, en el caso del primero, y aumento de C-HDL y Apo AI en el caso de la variante *V771M*<sup>187 179 188</sup>.

Existen varios trabajos que han estudiado el papel del polimorfismo *R219K de ABCA1* en la homeostasis del colesterol y la aterosclerosis, encontrando una asociación positiva entre la presencia de la mutación, el aumento del C-HDL y una progresión más lenta en el desarrollo de la enfermedad<sup>179 189 190</sup>.

Respecto al polimorfismo *V771M* del gen *ABCA1* Andrikovics et al en un estudio comparativo de sujetos con enfermedad cardiovascular respecto a controles sanos relacionaron el polimorfismo con efecto ateroprotector al observar un porcentaje de portadores de la mutación significativamente mayor en los sujetos sanos, observándose incluso una diferencia más llamativa en el caso de sujetos con EC por debajo de los 50 años de edad<sup>191</sup>. Otros trabajos como el publicado por Frikke-Schmidt et al, encontraron niveles de C-HDL y Apo AI

significativamente más elevados en la población femenina portadora de esta variante genética<sup>192 193</sup>.

## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



## HIPÓTESIS

Los niveles plasmáticos de colesterol HDL en niños españoles son elevados en comparación con otras poblaciones occidentales. Estos niveles han permanecido estables en los últimos años y no parecen relacionados con factores ambientales como la dieta, sugiriendo una influencia genética. Polimorfismos frecuentes en genes de proteínas claves del metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y sus interacciones con factores ambientales pueden estar relacionados con estos elevados niveles de C-HDL descritos en nuestra población.

## OBJETIVOS

1. Determinar la frecuencia de los polimorfismos: *MspI* -75 y *MspI* +83 en el gen de la apolipoproteína AI, *Taq IB* en el gen de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), *PON192* y *PON55* en el gen de la proteína paraoxonasa 1, y *R219K* y *V771M* en el gen de la proteína transportadora ABCA1, en la población española.
2. Analizar si el perfil lipídico en población infantil de edad prepuberal y en concreto los niveles de colesterol HDL y de apolipoproteína AI, están determinados por estos polimorfismos.
3. Analizar las posibles interacciones de éstos polimorfismos con factores ambientales tales como la dieta, el IMC y los niveles de DHEA-S, en relación con los niveles plasmáticos de lípidos en nuestra población.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## **1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

### **1.1. Población**

La población integrante de nuestro estudio la constituyen el total de niños de edad prepuberal del primer corte del Estudio Cuatro Provincias (4P)<sup>194</sup>. Este estudio se diseñó para evaluar diferentes factores de riesgo cardiovascular en niños de cuatro provincias españolas con distintas tasas de mortalidad cardiovascular e incluye niños de 6 a 8 años de edad, escolarizados en las provincias de Madrid, Orense, Cádiz y Murcia, sin ningún tipo de patología aguda o crónica que pueda afectar a las variables de interés.

El protocolo del estudio se sometió a la evaluación del Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación Jiménez Díaz. El conjunto de la investigación cumple las salvaguardias éticas de la Delegación de Helsinki, y sus posteriores actualizaciones, y la legislación española sobre investigación clínica en humanos.

### **1.2. Tamaño muestral**

En el cálculo del tamaño muestral necesario para caracterizar cada uno de los polimorfismos estudiados establecimos un nivel de confianza del 95% y asumimos que las diferencias entre los valores observados y los valores deseados no superasen el 4%. En estas condiciones el tamaño muestral máximo fue el requerido para el estudio del polimorfismo *Taq IB de CETP* con 560 niños.

### **1.3. Procedimiento de muestreo**

Se trata de un estudio transversal, en el que los niños se seleccionaron mediante un muestreo aleatorio, estratificado y por conglomerados, en el que las unidades de análisis de referencia eran los centros públicos, concertados o privados de las provincias participantes. El muestreo tuvo dos etapas. En la primera, se seleccionaron los centros escolares, a partir de los datos de la Delegación Provincial de Educación que incluían el total de los colegios de cada provincia participante. En la segunda, se seleccionaron los alumnos.

Los colegios fueron seleccionados de manera que aseguraran la representación de diferencias socio-económicas.

## **2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Los colaboradores de las distintas provincias (Prof. Ángel Gil en Madrid, Dr. Ovidio Fernández en Orense, Dr. Alipio Mangas y Dr. Alfonso Macías en Cádiz y Dr. Jacinto Fernández en Murcia) se encargaron de solicitar la autorización a la Delegación Provincial de Educación y al responsable del Área de Salud o equivalentes autonómicos. Una vez obtenido este permiso contactamos con las direcciones y asociaciones de padres de alumnos de los centros elegidos y se les explicó el sentido y finalidad del estudio. Una vez recibida la autorización por parte del colegio realizamos una presentación oral ante los padres de los niños seleccionados como candidatos al estudio, donde les entregamos una carta informativa y una autorización que tenían que firmar para que sus hijos participaran en el estudio.

A los colegios se desplazaron cinco ATS para realizar las extracciones, y un equipo de campo entrenado en la toma de medidas físicas a los niños y en la recogida de la información nutricional mediante el CFCA (cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos) y que se encargaba asimismo de la manipulación y correcto almacenaje de las muestras de sangre hasta su llegada al laboratorio de referencia.

Para ser incluido en el estudio, cada niño tenía que acudir con la autorización firmada por el padre, madre o responsable legal. La extracción se llevó a cabo a primera hora de la mañana y tras 12 horas de ayuno. A cada niño se le extraía, con material desechable, sangre por venopunción en dos tubos Venoject<sup>®</sup> (Terumo), uno de 7 ml y otro de 3 ml conteniendo EDTA-K<sub>3</sub> como anticoagulante.

Desde el momento de la extracción hasta su traslado al laboratorio para su análisis, las muestras permanecieron en hielo.

Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 3000 rpm y 4°C. Tras la centrifugación se obtenía, en la fracción inferior, las células que se trasvasaron a un tubo de vidrio reforzado que se congelaba a -70°C para posteriormente extraer el DNA, y en la fracción superior el plasma, que se alicuotó para las determinaciones lipídicas.

En las provincias de Orense, Cádiz y Murcia las muestras se centrifugaron inmediatamente después de la extracción y las células y el plasma eran guardados en criotubos, congelándolas a -70°C hasta su transporte en nieve carbónica a nuestro laboratorio en Madrid.

## 2.1. Determinaciones bioquímicas

Las determinaciones bioquímicas se realizaron en el Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal en Madrid, a cargo del Dr. Miguel Ángel Lasunción.

El plasma recogido se utilizó para las siguientes determinaciones lipídicas:

- El CT se valoró mediante técnica enzimática colesterol esterasa/colesterol oxidasa (Menarini) y posterior medición directa por absorción a 500 nm <sup>195</sup>.

- La medición del C-HDL se determinó en el sobrenadante que resultó al precipitar, añadiendo al plasma ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio <sup>196</sup>, las lipoproteínas que contienen Apo B y Apo E (LDL y VLDL) <sup>197</sup>, del plasma total. Tras la precipitación, el C-HDL se determinó en el sobrenadante mediante la misma técnica enzimática que el CT.

- Los TG se determinaron mediante método enzimático lipasa/oxidasa (Menarini) <sup>198</sup>.

- El C-LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald <sup>199</sup>:

$$\text{C-LDL} = \text{CT} - \text{TG}/5 - \text{C-HDL}$$

Siempre que el valor de TG fuese inferior a 300 mg/dL.

- Las determinaciones de la Apo AI y la Apo B se realizaron por métodos inmunoquímicos con anticuerpos específicos para la parte proteica de la molécula <sup>200</sup>.

Todas las determinaciones lipídicas se llevaron a cabo en un autoanalizador Array-1000.

La variabilidad analítica se evaluó mediante un control comercial (Precinorm y Precipath de Roche). Los coeficientes de variación interensayo fueron de 1.4% para el colesterol, 1.7% para los TG, 5.5% para la Apo AI y de 4.8% para la Apo B.

## **2.2. Determinaciones genéticas**

### **2.2.1. Obtención del DNA y cuantificación de DNA**

El DNA se obtuvo de glóbulos blancos de sangre periférica, utilizando un tampón de fuerza iónica baja que rompe la pared celular por ósmosis, permitiendo la obtención de los núcleos, y de estos el material genético.

Los aproximadamente 3 ml de células que se obtuvieron después de separar el plasma de la muestra, se distribuyeron en tubos de polipropileno de 50 ml, se llenaron con tampón Montreal-Baltimore Express 1, se equilibraron, si fue necesario, con el mismo tampón, se taparon y se mezclaron.

Se centrifugaron en una centrífuga de alta velocidad Beckman Avanti J-25 (rotor JA-20), durante 15 minutos a 13000 rpm y 4°C. Una vez terminada la centrifugación se decantaron, cuidando de no arrastrar el precipitado. Este precipitado se resuspendió en 4 ml de tampón Montreal 2, vertiendo los 4 ml en un homogeneizador, se homogeneizó la muestra hasta obtener una solución homogénea que se depositó otra vez en el tubo de 50 ml. Se añadió 100 µl de dodecil sulfato sódico-sal disódica (SDS) 20 % (Genaxis), se mezcló y se incubó

unos minutos en baño a 65°C, se añadió 150 µl de proteinasa K 10 mg/ml (Promega), dejándolo incubar toda la noche en baño a 65°C con agitación.

Tras la digestión con SDS y proteinasa K se precipitaron las proteínas añadiendo al lisado de 4 ml, 1.5 ml de solución saturada de NaCl, agitando, equilibrando los tubos y centrifugando durante 15 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transfirió a otro tubo de vidrio con tapón. En el nuevo tubo se precipitó el DNA añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto 100% (Merck) frío por uno de sobrenadante, se invirtió con suavidad hasta que se visualizó la hebra de DNA. Se recogió el DNA con una pipeta Pasteur y se transfirió a un eppendorf con 500 µl de Tris-EDTA (TE) 1X, se dejó disolver el DNA durante toda la noche en un agitador orbital antes de cuantificar.

La concentración de DNA se midió utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640B.

Los ácidos nucleicos absorben a 260 nm y las proteínas a 280 nm, y con la medida de estas dos absorbancias podemos calcular la concentración de ambos. Para considerar que un DNA está suficientemente purificado, la relación Abs260/Abs280 debía estar entre 1.8 y 2.

El programa nos midió la absorbancia a 260 nm, debida a los ácidos nucleicos, y a 280 nm, debida a las proteínas y en función de estos valores nos calculó la concentración tanto de proteínas como de ácidos nucleicos. Para calcular la concentración real de nuestra muestra, teníamos que multiplicar la concentración por el factor de dilución.



### 2.2.2. Determinaciones de los polimorfismos estudiados

#### Determinación de los polimorfismos *MspI* -75 y +83 de *APOAI*

Los polimorfismos de *APOAI MspI* -75 y +83 están localizados en la región promotora (en posición -75pb antes del inicio de la transcripción) y en el intrón 1 (en posición +83pb), respectivamente, del gen *APOAI*. Dan lugar en la apolipoproteína a un cambio de guanina por adenina en el caso del polimorfismo *MspI* -75 y a un cambio de citosina por timina en el caso del polimorfismo *MspI* +83.

Para la determinación de estos polimorfismos de *APOAI* se amplificó el DNA mediante técnica PCR (“Polymerase Chain Reaction”, Reacción en Cadena de la Polimerasa) en un termociclador (PTC-100) utilizando los siguientes oligonucleótidos <sup>201</sup>:

*MspI* -1 (5' AGGGACAGAGCTGATCCTTGAAGCTCTTAAG 3')

*MspI* -2 (5' TTAGGGGACACCTACCCGTCAGGAAGAGCA 3')

Cada amplificación contenía aproximadamente 300 ng de DNA, 0.2 mM de cada nucleótido, 1μM de cada oligonucleótido y 1U de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μl. La reacción se inicio con una desnaturalización del DNA durante 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos, cada uno de ellos consistente en una desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, hibridación durante 30 segundos a 55°C y extensión durante 30 segundos a 72°C, seguidos por una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de esta reacción, de 432 pb de longitud, se digirió con 4U de la enzima de restricción *MspI* <sup>201</sup>. Los fragmentos resultantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturalizante

al 8%. En este caso los dos polimorfismos estudiados se determinan simultáneamente ya que en el mismo fragmento amplificado la enzima *MspI* tiene tres lugares de corte: 75 pb antes del punto de inicio de la transcripción, y 37 y 83 pb después de este punto.

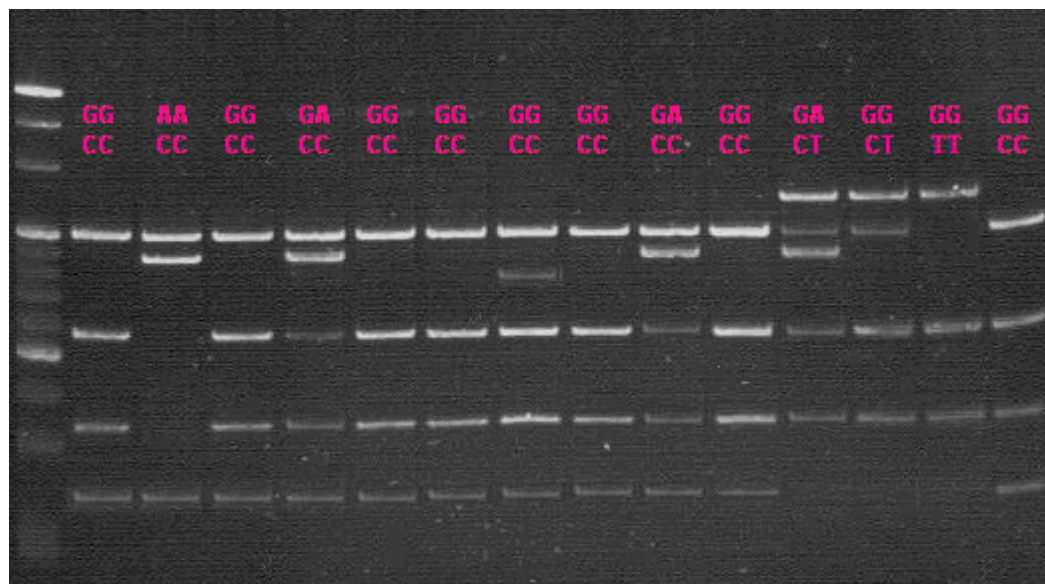
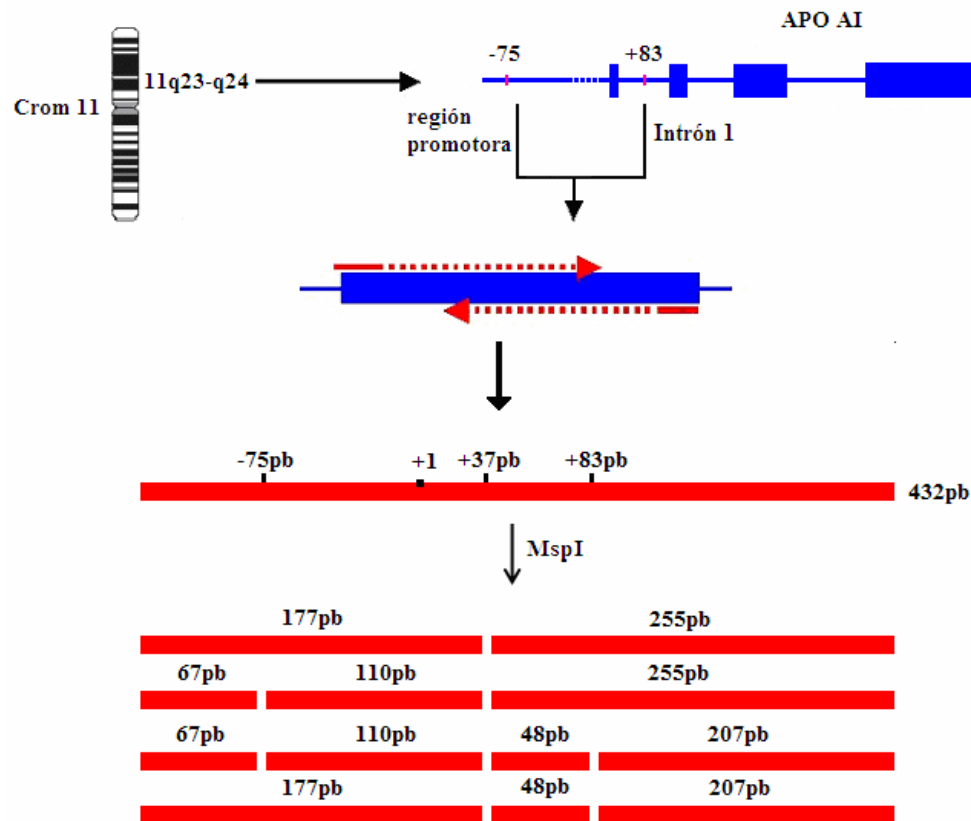
La variante *MspI* +37 de *APOAI* se caracteriza por un cambio de citosina por timina en posición +37. En nuestra población no hemos observado portadores de este polimorfismo ya que todos los niños eran homocigotos para el alelo no mutado (genotipo CC), en este caso ante la presencia de alelo C la enzima *MspI* reconoce su secuencia de restricción en posición +37 y corta el fragmento amplificado, obteniéndose dos fragmentos de 177 y 255pb.

En la variante *MspI* -75 de *APOAI* el alelo más frecuente es el alelo G (no mutado), en este caso la enzima reconoce la diana de restricción y corta dando lugar a dos fragmentos de 67 y 110pb (alelo G). Si se ha producido el cambio a que da lugar al polimorfismo (alelo G  $\rightarrow$  A) desaparece la diana de restricción y la enzima *MspI* no corta obteniéndose un fragmento de 177pb (alelo A).

Respecto al polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* el alelo más frecuente también es el alelo no mutado (alelo C). Ante la presencia de este alelo la enzima *MspI* reconoce su secuencia de restricción y corta originando dos fragmentos de 48 y 207pb (alelo C). En el caso de que se haya producido el cambio a que da lugar al polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* (alelo C  $\rightarrow$  T) la enzima *MspI* no encuentra la secuencia de restricción y no corta originándose un fragmento de 255pb (alelo T). El mapa de restricción de este análisis se muestra en la Figura 9.

En nuestra población no hemos encontrado todas las posibles combinaciones de los tres genotipos de estos polimorfismos y por tanto en el gel

de poliacrilamida mostrado (Figura 9) solo se describen los genotipos observados en nuestra población.



**Figura 9:** Mapa de restricción y gel de poliacrilamida de los polimorfismos *MspI* -75 y +83 de *APOAI*.

**Determinación del polimorfismo *Taq IB* de *CETP***

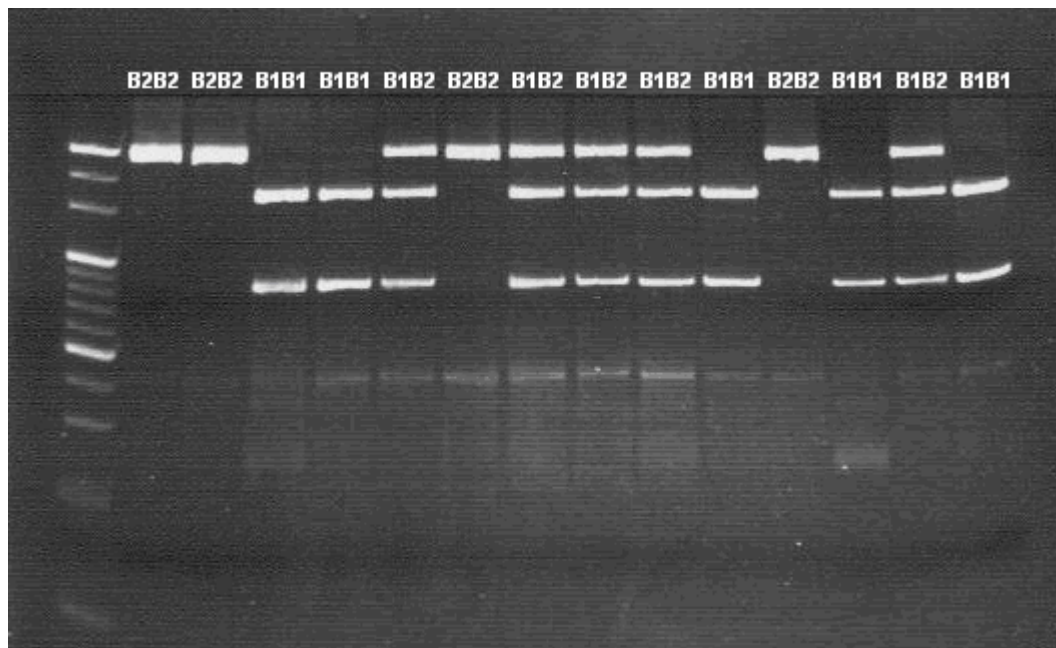
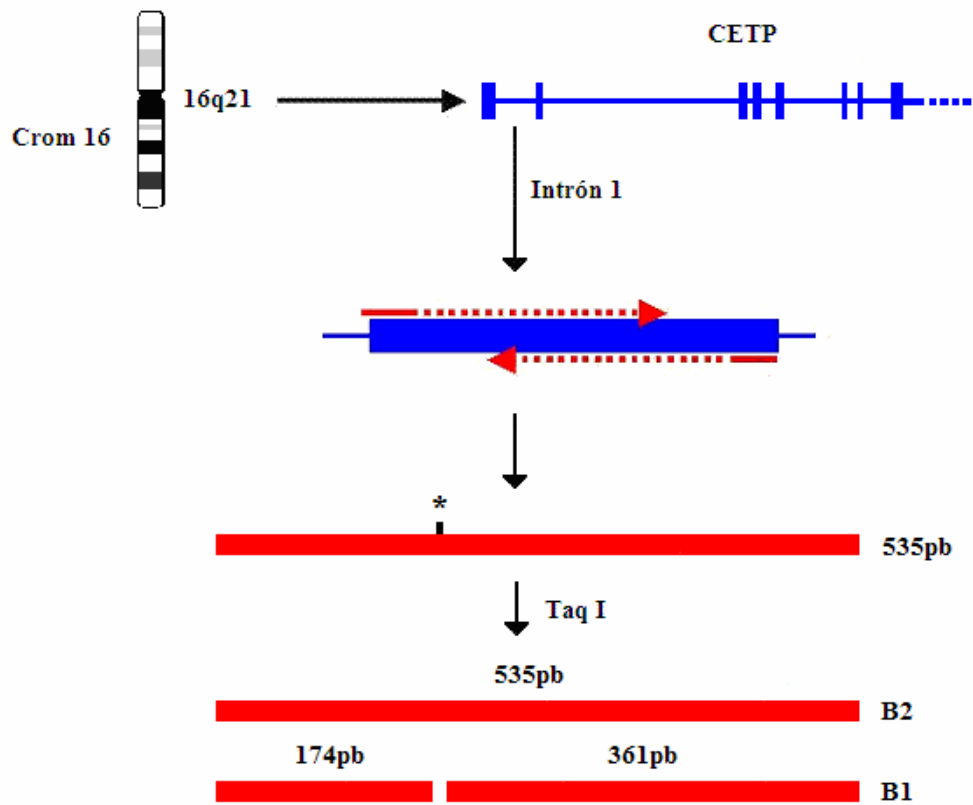
El polimorfismo *Taq IB* está localizado en el intrón 1 y da lugar a un cambio de guanina por adenina en posición 277pb en el gen *CETP* <sup>159</sup>.

Para la determinación del polimorfismo *Taq IB* el DNA se amplificó mediante técnica PCR en un termociclador (PTC-100) utilizando los siguientes oligonucleótidos <sup>202</sup>:

*Taq IB-1* (5'CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC 3')

*Taq IB-2* (5'CTGAGCCCAGCCGCACACTAAC 3')

Cada amplificación contenía aproximadamente 300 ng de DNA, 0.2 mM de cada nucleótido, 0.7μM de cada oligonucleótido y 1U de *Taq* DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μl. La reacción se inicio con una desnaturalización del DNA durante 5 minutos a 95°C, seguida por 30 ciclos, cada uno de ellos consistente en una desnaturalización durante 30 segundos a 95°C, hibridación durante 30 segundos a 60°C y extensión durante 30 segundos a 72°C, seguidos por una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de esta reacción, de 535 pb de longitud, se digirió con 5U de la enzima de restricción *TaqI* <sup>157</sup>. Los fragmentos resultantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%. En el caso del alelo no mutado B1 la enzima reconoce una diana de restricción y corta obteniéndose dos fragmentos de 174 y 361pb, mientras que en el caso del alelo mutado B2, no hay diana de restricción para la enzima y se obtiene un único fragmento de 535 pb. El mapa de restricción de este polimorfismo se muestra en la Figura 10.



**Figura 10:** Mapa de restricción y gel de polimacrilamida del polimorfismo *Taq IB* de CETP.

**Determinación del polimorfismo *PON192* de *PON1***

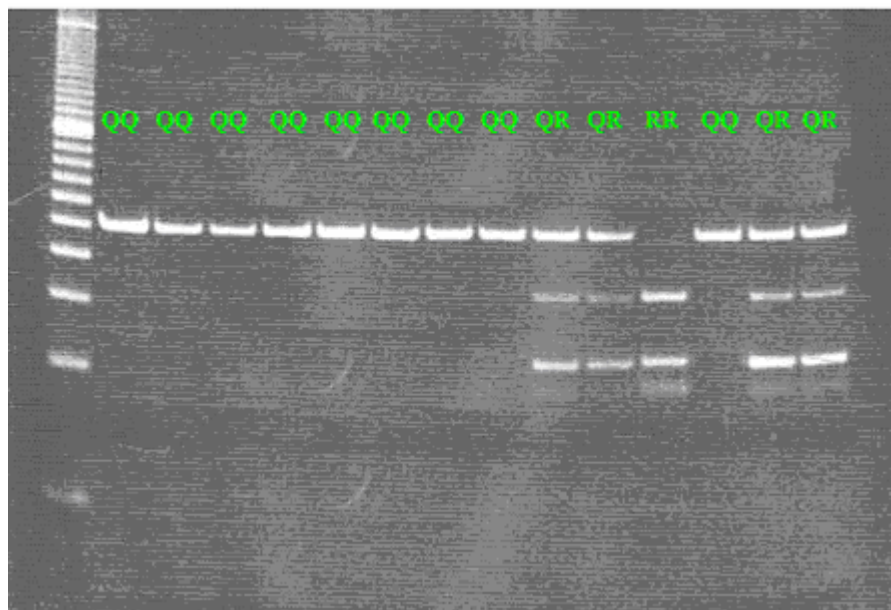
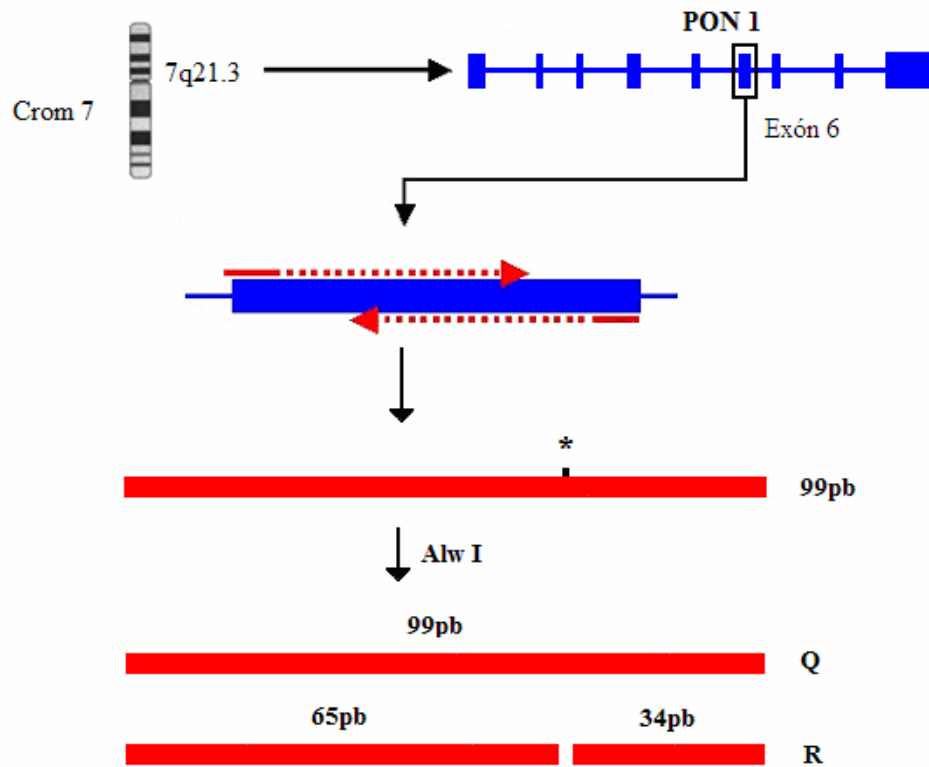
El polimorfismo en la posición 192 del gen *PON1* (*PON192Q/R*) da lugar a un cambio de adenina por guanina que origina un cambio de Glutamina por Arginina en el aminoácido 192 de la proteína paraoxonasa 1. El polimorfismo está localizado en la región codificante del gen *PON1*, en el exón 6.

Para la determinación de este polimorfismo de *PON1* se siguió un proceso similar al de los polimorfismos anteriormente descritos. El DNA se amplificó mediante técnica PCR en un termociclador (PTC-100) utilizando los siguientes oligonucleótidos <sup>203</sup>:

*PON192-1* (5' TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG 3')

*PON192-2* (5' GACATACTTGCCATCGGGTGAA3')

Cada amplificación contenía aproximadamente 300 ng de DNA, 0.2 mM de cada nucleótido, 1μM de cada oligonucleótido y 1U de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μl. La reacción se inicio con una desnaturalización del DNA durante 5 minutos a 96°C, seguida por 30 ciclos, cada uno de ellos consistente en una desnaturalización durante 1 minuto a 94°C, hibridación durante 1 minuto a 61°C y extensión durante 1 minuto a 72°C, seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de esta reacción, de 99 pb de longitud, se digirió con 2U de la enzima de restricción AlwI <sup>204</sup>. Los fragmentos resultantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%. En el caso del alelo Q, la secuencia de corte de la enzima AlwI no está presente y se obtiene un fragmento de 99 pb, mientras que en el caso del alelo mutado R, sí está presente esta secuencia y se obtienen dos fragmentos de 34 y 65pb. El mapa de restricción de este polimorfismo se muestra en la Figura 11.



**Figura 11:** Mapa de restricción y gel de poliacrilamida del polimorfismo *PON1*92 de *PON1*.

**Determinación del polimorfismo *PON55* de *PONI***

El polimorfismo en la posición 55 del gen *PONI* (*PON55L/M*) da lugar a un cambio de una adenina por una timina, guanina o citosina que origina un cambio de Leucina por Metionina en la proteína paraoxonasa 1. Este polimorfismo está localizado en la región codificante del gen *PONI*, en el exón 3.

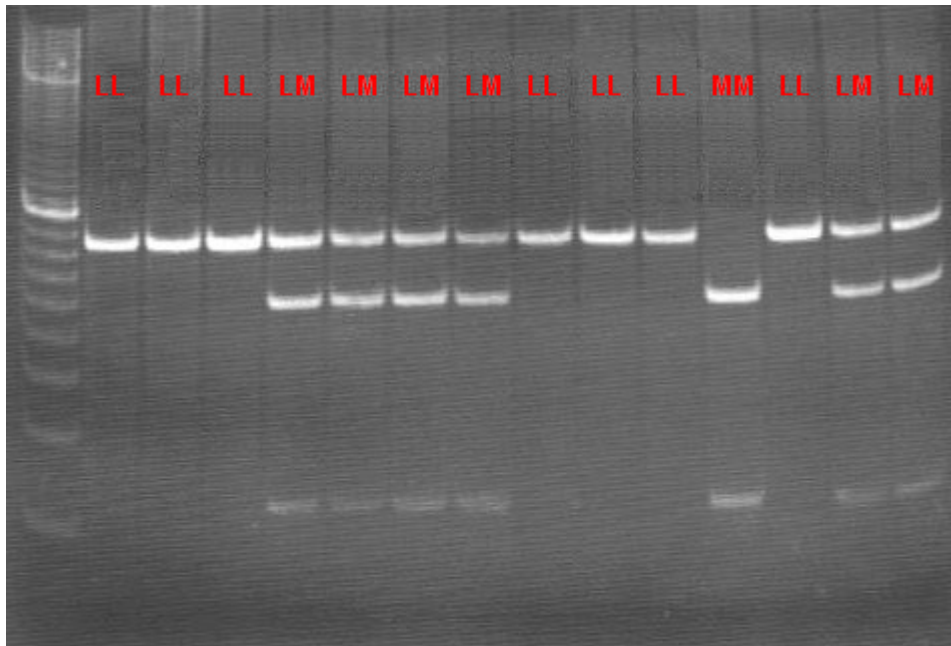
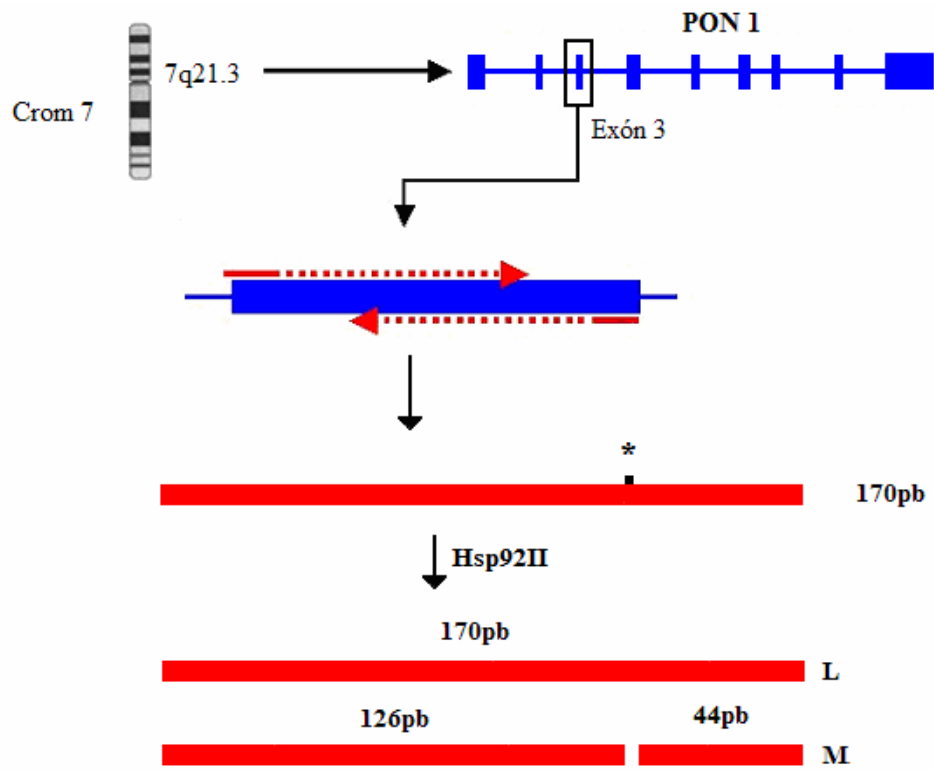
La determinación del polimorfismo *PON55L/M* de *PONI* se llevó a cabo mediante la amplificación del DNA mediante técnica PCR en un termociclador (PTC-100) utilizando los siguientes oligonucleótidos<sup>203</sup>:

*PON55-1* (5' GAAGAGTGATGTATAGCCCCCAG3')

*PON55-2* (5' TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCCC3')

Cada amplificación contenía aproximadamente 300 ng de DNA, 0.2 mM de cada nucleótido, 1μM de cada oligonucleótido y 1U de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μl. La reacción se inicio con una desnaturalización del DNA durante 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos, cada uno de ellos consistente en una desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, hibridación durante 30 segundos a 61°C y extensión durante 30 segundos a 72°C, seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de esta reacción, de 170 pb de longitud, se digirió con 2U de la enzima de restricción Hsp92II<sup>174</sup>. Los fragmentos resultantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%. En el caso del alelo L (no mutado), no está presente el sitio de restricción de la enzima y se obtiene el mismo fragmento de 170 pb, mientras que en el caso del alelo M (mutado), si está presente la diana de restricción y la enzima corta dando lugar a dos fragmentos de 44 y 126pb. El mapa de restricción de este polimorfismo se muestra en la Figura 12.





**Figura 12:** Mapa de restricción y gel de poliacrilamida del polimorfismo *PON 55 de PON1*.

**Determinación del polimorfismo *R219K* del gen *ABCA1***

El polimorfismo *R219K* (G1051A, cambio de una guanina por una adenina en posición 1051) está localizado en el exón 7 del gen *ABCA1* y da lugar a un cambio aminoacídico de Arginina por Lisina, en el aminoácido 219 de la proteína ABCA1.

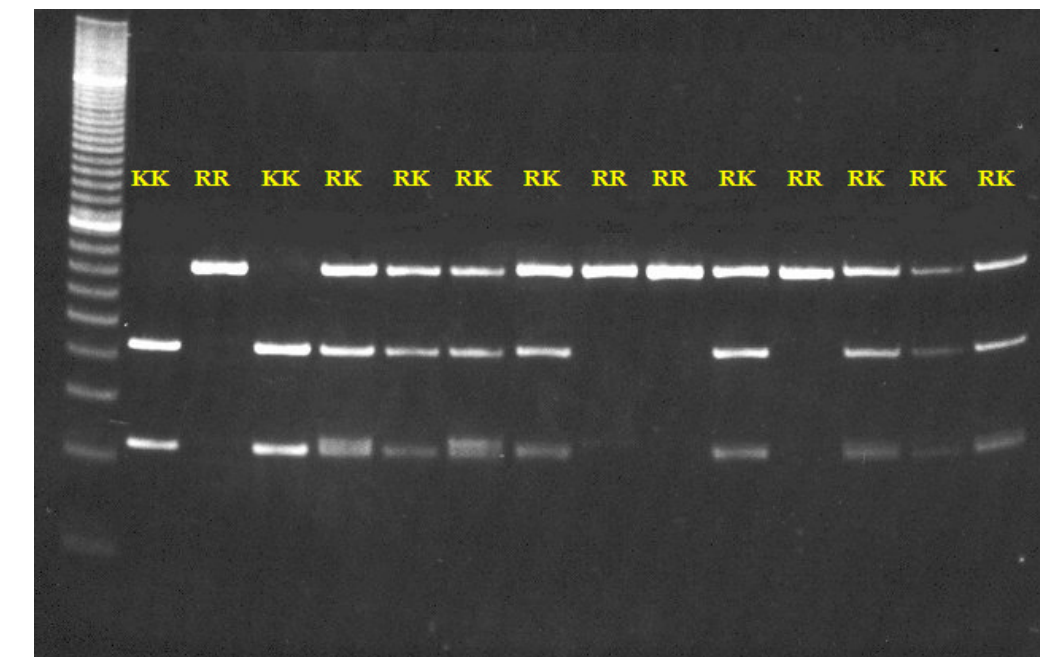
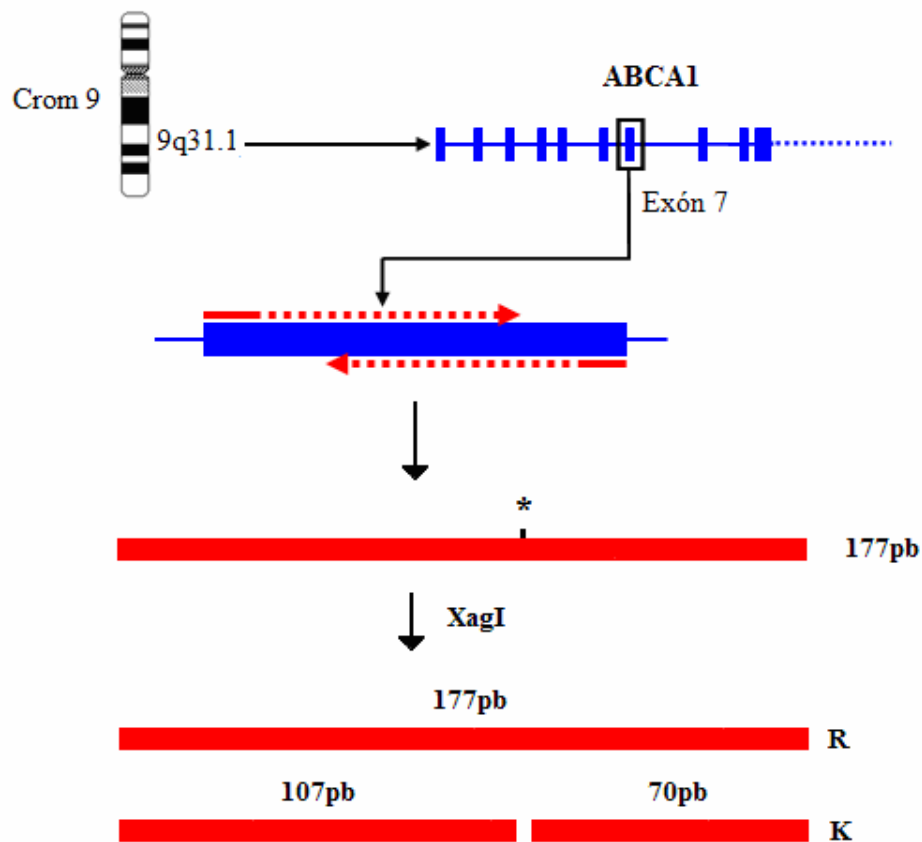
El DNA se amplificó mediante técnica PCR en un termociclador (PTC-100) utilizando los siguientes oligonucleótidos <sup>179</sup>:

*ABCA1 219-1* (5' GTATTTTGTGCAAGGCTACCAGTTACATTTGACAA 3')

*ABCA1 219-2* (5' GATTGGCTTCAGGATGTCCATGTTGGAA 3')

Cada amplificación contenía aproximadamente 300 ng de DNA, concentración de 0.2mM de cada nucleótido, 1μM de cada oligonucleótido y 2U de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μl. La reacción se inicio con una desnaturalización del DNA durante 5 minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos, cada uno de ellos consistente en una desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, hibridación durante 30 segundos a 60°C y extensión durante 30 segundos a 72°C, seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de esta reacción, de 177 pb de longitud, se digirió con 10U de la enzima de restricción XagI. Los fragmentos resultantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%. En el caso de que haya una guanina en posición 1051 (alelo R no mutado), no hay sitio de restricción para la enzima XagI y no corta obteniéndose el mismo fragmento de 177 pb, mientras que en el caso de que haya una adenina (alelo K mutado), sí está presente esta secuencia de restricción y la

enzima corta obteniéndose dos fragmentos de 107 y 70 pb. El mapa de restricción de este polimorfismo se muestra en la Figura 13.



**Figura 13:** Mapa de restricción y gel de poliacrilamida del polimorfismo R219K de ABCA1.

**Determinación del polimorfismo *V771M (G2706A)* del gen *ABCA1***

El polimorfismo *V771M* (G2706A, cambio de una guanina por una adenina en posición 2706) está localizado en el exón 16 del gen *ABCA1* y da lugar a un cambio de Valina por Metionina, en el aminoácido 771, en la proteína transportadora ABCA1.

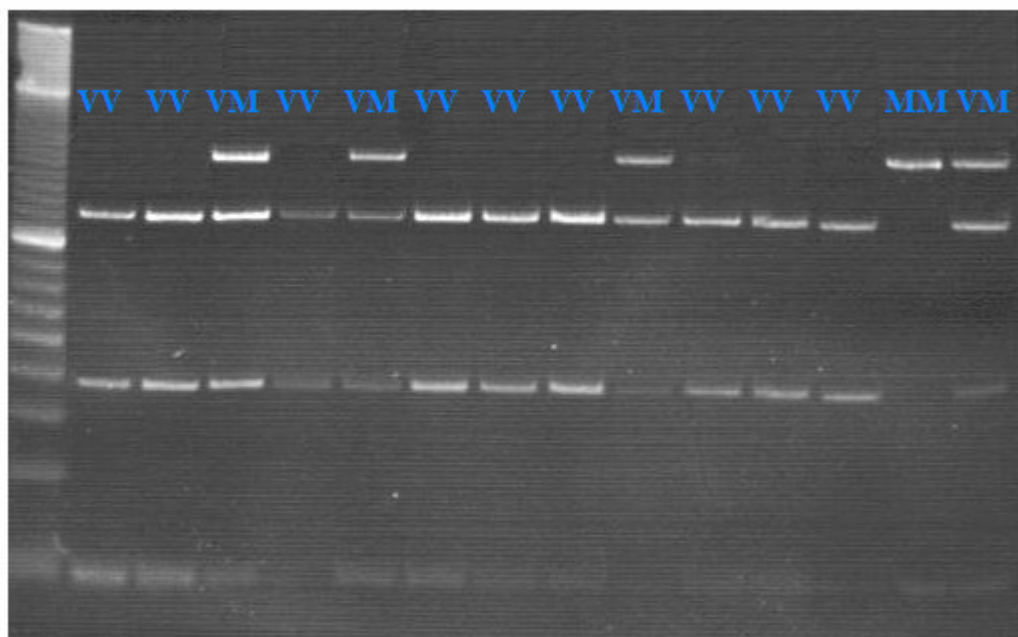
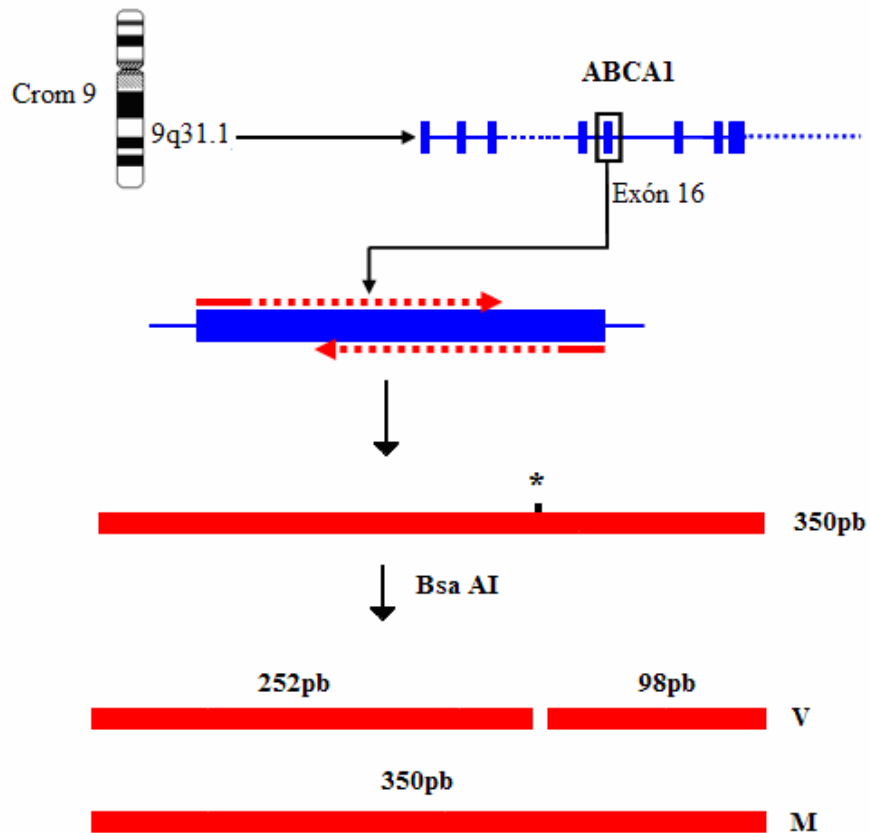
Para la determinación del polimorfismo *V771M de ABCA1*, se siguió un proceso similar al del resto de los polimorfismos estudiados. El DNA se amplificó mediante técnica PCR en un termociclador (PTC-100) utilizando los siguientes oligonucleótidos<sup>179</sup>:

*ABCA1 V771M-1* (5' CAA GTG AGT GCT TGG GAT TG3')

*ABCA1 V771M-2* (5' TGC TTT TAT TCA GGG ACT CCA 3')

Cada amplificación contenía aproximadamente 300 ng de DNA, una concentración de 0.2mM de cada nucleótido, 1μM de cada oligonucleótido y 2U de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μl. La reacción se inicio con una desnaturalización del DNA durante 5 minutos a 94°C seguida por 30 ciclos, cada uno de ellos consistente en una desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, hibridación durante 30 segundos a 60°C y extensión durante 30 segundos a 72°C, seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de esta reacción de una longitud de 350 pb, se digirió con 5U de la enzima de restricción BsaAI. Los fragmentos resultantes se separaron en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%. En el caso de que haya una guanina en posición 2706 (alelo V no mutado), se obtienen dos fragmentos de 252 y 98 pb, mientras que si hay una adenina en posición 2706 (alelo M mutado), no hay diana de restricción

para la enzima y se obtiene el mismo fragmento amplificado de 350 pb. El mapa de restricción de este polimorfismo se muestra en la Figura 14.



**Figura 14:** Mapa de restricción y gel de poliacrilamida del polimorfismo V771M de ABCA1.

### **3. MEDIDAS FÍSICAS**

De cada niño se recogió el peso y la talla en el momento de la extracción, y a partir de estas medidas se calculó el IMC (Peso en Kg/Talla<sup>2</sup> en m). Las medidas se realizaron con los niños vestidos con ropa ligera y sin zapatos. La talla se midió con un estadiómetro portátil y el peso se midió con una balanza electrónica digital homologada.

### **4. INFORMACIÓN ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL**

Esta información la obtuvimos a través de un Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos (CFCA), que ha sido validado en España por el grupo de investigación dirigido por el Prof. José M<sup>a</sup> Martín Moreno, este cuestionario ha sido modificado y adaptado para la población infantil utilizando para dichos cambios las Guías de Alimentación Escolar y la Encuesta Nacional de Nutrición y Alimentación de España (Anexo).

Este método nos interesa porque mide el consumo medio habitual de un determinado alimento o grupo de alimentos a lo largo de un año y no en un periodo de tiempo determinado, lo que nos va a permitir obtener patrones de consumo de determinados alimentos en distintas poblaciones.

El CFCA está estructurado en torno a una lista de alimentos, a una porción estándar distinta para cada alimento y a una frecuencia de consumo.

La lista de alimentos está estructurada en los siguientes grupos: productos lácteos, huevos, carnes y pescados, verduras y hortalizas, legumbres y cereales, aceites y grasas, precocinados o preelaborados, bollería y pastelería, frutas,

bebidas, y misceláneos, y finalmente se registraba si el niño tomaba suplementos vitamínicos. En cuanto a la frecuencia de consumo, esta puede ser: Número de veces al día, número de veces a la semana, número de veces al mes, número de veces al año, nunca.

El mismo equipo de campo entrenado mediante sesiones demostrativas de cómo utilizar el CFCA cumplimentó el cuestionario con la madre, padre o persona que acompañara al niño, inmediatamente después de la extracción de sangre.

Cada encuesta se realiza en 20-30 minutos para conseguir que las respuestas sean lo más cercanas a la realidad y crear un ambiente propicio entre encuestador y encuestado. Para la cumplimentación del CFCA tuvimos que tener en cuenta si el niño/a comía en el comedor escolar y si era así solicitábamos el menú de cada colegio para su posterior integración en el cuestionario.

Las mismas personas encargadas de realizar las encuestas fueron las encargadas de la introducción de los datos en un programa creado para este fin. El procesamiento de la información dietética se llevó a cabo mediante la conversión de los distintos alimentos en sus nutrientes usando la tabla de composición de alimentos de Moreiras et al <sup>205</sup> y para los casos en los que no existieran datos para alimentos concretos, se amplió con las tablas de alimentos españoles de Mataix et al <sup>206</sup>.

## **5. ENTREGA DE LOS RESULTADOS**

A todos los niños, si la muestra lo permitía, se les entregó en el plazo de 20 días un informe sobre su perfil lipídico estándar (CT, TG, C-HDL y C-LDL) al

igual que los valores de normalidad para dichos parámetros. A los padres de los niños a los que no se pudo realizar la extracción se les remitió una carta agradeciéndoles su colaboración y explicándoles el motivo por el que dicha extracción no se pudo llevar a cabo.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS 9.0 para Windows.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables, en el que se calcularon medias y desviación estándar. Las correlaciones entre variables antropométricas y variables bioquímicas se evaluaron determinando los coeficientes de correlación de Spearman.

Las frecuencias de alelos y genotipos se determinaron mediante método de conteo.

Utilizamos ANOVA para comparar los niveles medios de lípidos y apolipoproteínas de los distintos genotipos en la población total y en niños y niñas por separado, y cuando encontramos diferencias significativas, utilizamos un test Tukey para comparar cada par de grupos, siempre que las varianzas fueran homogéneas. En el caso de que las varianzas no fueran homogéneas, se utilizó un test T2 de Tamhane. Para comparar medias de lípidos y variables antropométricas entre niños y niñas utilizamos un test t de Student.

Para evaluar la modulación de la dieta, el IMC y los niveles de DHEA-S sobre el efecto del genotipo de cada polimorfismo en los niveles de lípidos plasmáticos llevamos a cabo un análisis ANOVA o un test t de Student



segregando la población por terciles de dichas variables. En el caso del análisis de la influencia de la dieta sobre el efecto de los polimorfismos estudiados se estableció como criterio de significación estadística  $p < 0.01$  para obtener mayor potencia estadística.



## RESULTADOS

### 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Para llevar acabo el estudio se seleccionaron seis colegios en cada provincia y se invitó a participar aproximadamente a 50 niños. En total se recibió la autorización escrita por parte de los padres de 1324 niños/as, alcanzándose una tasa de respuesta global del 85%, muy similar en las cuatro provincias estudiadas. El análisis bioquímico y genético se pudo completar en 1255 niños/as, de esta población 622 (49.6%) eran niñas y 633 (50.4%) eran niños.

La edad y las características antropométricas de la población estudiada se presentan en la Tabla 3. Al realizar un análisis t-test entre sexos no se observaron diferencias significativas en los valores medios de edad, peso, talla e IMC entre niños y niñas.

**Tabla 3:** Edad y variables antropométricas de la población estudiada.

	TOTAL (n=1255)	NIÑOS (n=633)	NIÑAS (n=622)
EDAD (años)	6.7±0.7	6.7±0.7	6.7±0.7
PESO (Kg)	26.8±5.4	26.9±5.3	26.7±5.4
TALLA (m)	1.25±0.1	1.26±0.1	1.25±0.1
IMC (Kg/m)	17.0±2.4	17.0±2.4	17.0±2.5

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

En la Tabla 4 se muestran los niveles medios de los distintos parámetros lipídicos analizados, tanto en el total de la población como para los dos sexos por separado. Se ha observado que los niños presentan niveles de Apo AI significativamente más elevados y niveles de Apo B significativamente más bajos que las niñas. En el resto de las variables bioquímicas analizadas no se han observado diferencias entre niños y niñas.

**Tabla 4:** Perfil lipídico en (mg/dL) de la población estudiada.

	<b>TOTAL (n=1255)</b>	<b>NIÑOS (n=633)</b>	<b>NIÑAS (n=622)</b>	<b>P</b>
<b>CT</b>	183.1±28.6	182.6±28.4	183.5±28.7	ns
<b>C-HDL</b>	59.4±13.2	60.1±13.1	58.7±13.2	ns
<b>Apo AI</b>	137.0±19.0	138.3±18.9	135.6±19.0	*
<b>C-LDL</b>	109.1±27.3	108.1±27.7	110.1±26.8	ns
<b>Apo B</b>	70.3±15.0	69.2±15.0	71.4±15.0	*
<b>TG</b>	72.6±26.1	71.3±25.4	74.0±26.6	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.  
p: t-test análisis comparando niños y niñas \*p<0.05.

En la Tabla 5 se muestran las correlaciones de las variables antropométricas con las variables bioquímicas estudiadas en nuestra población. En un análisis de correlación de Spearman no hemos observado ninguna correlación significativa entre estas variables con excepción del IMC que correlaciona de forma positiva con los niveles plasmáticos de TG.

**Tabla 5.** Coeficientes de correlación de Spearman de las variables antropométricas con las variables bioquímicas en la población estudiada.

	CT (mg/dL)	C-HDL (mg/dL)	APO AI (mg/dL)	C-LDL (mg/dL)	APO B (mg/dL)	TG (mg/dL)
<b>PESO (Kg)</b>	0.005	-0.041	-0.044	0.005	0.006	0.058
<b>TALLA (m)</b>	-0.023	-0.001	-0.061	-0.018	-0.027	-0.019
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	0.013	-0.059	-0.009	0.015	0.024	0.112**

Coefficientes Correlación de Spearman \*\*p<0.01.

## 2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO *MspI* EN LA POSICIÓN -75 DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA AI (*Msp I* -75 de *APOAI*)

### 2.1. Frecuencias del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI*

En la Tabla 6 se muestran las frecuencias de los genotipos y de los alelos para el polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* en la población total y por sexos. Se observa una frecuencia de un 68.8% para el genotipo GG, aproximadamente un 28% de heterocigotos GA y un 3.3% de homocigotos para la mutación (AA). En nuestra población el alelo mutado A está presente en aproximadamente un 17% de la población.

**Tabla 6:** Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* en la población estudiada.

	TOTALES (n=1252)	NIÑOS (n=631)	NIÑAS (n=621)
<b>GG</b>	68.8% (861)	69.2% (437)	68.3% (424)
<b>GA</b>	27.9% (350)	28.1% (177)	27.9% (173)
<b>AA</b>	3.3% (41)	2.7% (17)	3.9% (24)
<b>G</b>	82.7% (2072)	83.3% (1051)	82.2% (1021)
<b>A</b>	17.3% (432)	16.7% (211)	17.8% (221)

## 2.2. Influencia del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* sobre los niveles plasmáticos de lípidos

En las Tablas 7, 8 y 9 se muestran los niveles plasmáticos de lípidos y apolipoproteínas asociados a cada genotipo del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI*, en la población total y por sexos.

En un análisis de ANOVA no hemos encontrado diferencias significativas entre los tres genotipos en relación a las variables lipídicas analizadas ni el grupo total ni al estudiar la población separándola por sexo.

**Tabla 7:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* en la población estudiada.

	<b>GG (n=861)</b>	<b>GA (n=350)</b>	<b>AA (n=41)</b>
<b>CT</b>	183.1±27.6	182.8±29.1	181.5±31.0
<b>C-HDL</b>	59.0±13.3	60.5±12.8	61.8±11.1
<b>Apo AI</b>	136.3±19.1	138.6±18.3	139.4±21.3
<b>C-LDL</b>	109.5±26.0	107.8±28.3	105.7±26.8
<b>Apo B</b>	70.4±14.7	69.9±14.9	68.9±16.2
<b>TG</b>	72.8±27.5	72.0±22.1	74.6±27.22

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 8:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *MspI*-75 de *APOAI* en niños.

	<b>GG (n=437)</b>	<b>GA (n=177)</b>	<b>AA (n=17)</b>
<b>CT</b>	182.7±27.4	180.4±25.4	182.9±27.1
<b>C-HDL</b>	59.7±13.0	61.2±13.3	64.7±11.4
<b>Apo AI</b>	137.9±19.1	138.8±18.1	145.5±21.3
<b>C-LDL</b>	108.5±25.6	106.5±29.2	102.8±25.6
<b>Apo B</b>	69.4±14.6	68.5±14.6	67.3±16.1
<b>TG</b>	72.1±27.7	68.6±18.9	77.1±18.9

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 9:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *MspI*-75 de *APOAI* en niñas.

	<b>GG (n=424)</b>	<b>GA (n=173)</b>	<b>AA (n=24)</b>
<b>CT</b>	183.4±27.9	184.2±29.4	180.5±34.1
<b>C-HDL</b>	58.2±13.6	59.8±12.3	59.8±10.6
<b>Apo AI</b>	134.6±18.9	138.4±18.6	134.6±20.6
<b>C-LDL</b>	110.5±26.4	109.3±27.5	107.9±28.0

<b>Apo B</b>	71.4±14.8	71.4±15.1	70.1±16.6
<b>TG</b>	73.6±27.3	75.5±24.5	71.5±31.9

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

### 2.3. Influencia de la dieta en el efecto del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* sobre los niveles de lípidos plasmáticos

Considerando la conocida influencia de la dieta, fundamentalmente de la ingesta de grasa, en el efecto del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* sobre el perfil lipídico, hemos analizado si en nuestra población dicha ingesta afecta a la relación de este polimorfismo con los lípidos plasmáticos.

Para ello hemos estudiado el efecto que esta variante genética tiene en el perfil lipídico de nuestros niños en función de la ingesta diaria de grasa total, saturada, monoinsaturada y poliinsaturada expresada en mg/día. En el caso de la ingesta de grasa total en mg/día (Tabla 10) se ha observado que, en el tercil 1 (baja ingesta de grasa total) los portadores del genotipo GA presentan niveles de Apo I significativamente más elevados ( $p=0.003$ ) que los que no son portadores de la mutación (genotipo GG). En los terciles de media y alta ingesta de grasa total ambos genotipos (GG y GA) presentan niveles medios de Apo AI prácticamente idénticos. Respecto a los niveles del resto de las variables bioquímicas analizadas no hemos observado diferencias entre genotipos en ningún tercil.

En la Tabla 11 se muestran los niveles de lípidos plasmáticos según genotipos del polimorfismo *MspI* de *APOAI* por terciles de ingesta diaria de grasa saturada en mg/día. De nuevo encontramos que en el tercil 1, que corresponde a



baja ingesta de grasa saturada (mg/día) los portadores de un alelo mutado (genotipo GA) presentan niveles de Apo AI claramente más elevados, respecto a los portadores de genotipo no mutado GG (140.5 vs 134.0 mg/dL), alcanzándose una significación estadística  $p=0.007$ , en este caso tampoco observamos diferencias entre genotipos en los niveles de Apo AI en los terciles 2 y 3.

No se han encontrado diferencias en la influencia del genotipo del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* en el perfil lipídico en función del tercil de ingesta de grasa monoinsaturada ni de poliinsaturada.

Al realizar estos mismos análisis en niños y niñas por separado hemos observado un comportamiento idéntico al descrito en el grupo total por lo que los resultados se muestran en el total de la población.



**Tabla 10.** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* por terciles de ingesta diaria de grasa total (mg/día) en la población estudiada.

	TERCIL 1 (51.2-95.1)mg/día				TERCIL 2 (95.2-116.0)mg/día				TERCIL 3 (116.1-241.8)mg/día			
	GG (n=242)	GA (n=96)	AA (n=14)	P	GG (n=242)	GA (n=99)	AA (n=11)	P	GG (n=243)	GA (n=102)	AA (n=10)	P
<b>CT</b>	183.3±26.6	186.6±25.4	173.2±27.9	ns	183.3±28.1	183.8±34.1	185.7±28.3	ns	183.3±27.2	178.9±26.2	190.2±39.2	ns
<b>C-HDL</b>	57.2±12.9	59.2±12.6	61.1±10.1	ns	59.3±13.7	60.6±13.5	59.9±10.1	ns	58.9±13.2	60.2±12.8	64.3±13.6	ns
<b>Apo AI</b>	133.3±19.7	140.2±18.3	135.5±23.0	0.003	137.4±18.7	137.5±17.9	138.7±17.3	ns	138.1±19.4	138.9±19.7	147.8±20.8	ns
<b>C-LDL</b>	112.0±26.9	112.0±23.8	100.0±21.4	ns	109.1±27.4	108.4±33.5	111.7±24.3	ns	109.6±24.4	105.1±26.7	110.6±38.4	ns
<b>Apo B</b>	72.0±15.8	72.3±13.8	64.6±12.6	ns	70.3±15.2	72.0±14.6	70.4±13.7	ns	70.4±13.6	67.3±15.4	75.1±24.3	ns
<b>TG</b>	72.8±23.1	76.5±25.1	71.4±21.3	ns	74.8±30.7	73.7±23.0	70.7±22.5	ns	73.7±23.1	68.0±16.5	76.5±27.0	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: t-test análisis comparando genotipos GG-GA.

**Tabla 11.** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* por terciles de ingesta diaria de grasa saturada (mg/día) en la población estudiada.

	TERCIL 1 (14.3-34.2) mg/día				TERCIL 2 (34.3-42.0) mg/día				TERCIL 3 (42.1-104.5) mg/día			
	GG (n=248)	GA (n=91)	AA (n=13)	P	GG (n=237)	GA (n=105)	AA (n=11)	P	GG (n=242)	GA (n=100)	AA (n=11)	P
<b>CT</b>	181.3±29.2	185.3±30.0	171.3±30.0	ns	186.6±28.4	185.6±25.6	179.3±34.8	ns	182.6±25.3	176.4±24.9	197.4±26.1	ns
<b>C-HDL</b>	58.2±13.5	60.6±12.8	61.3±12.2	ns	58.4±12.2	60.9±12.8	57.7±5.4	ns	58.7±14.1	58.5±13.3	66.0±13.0	ns
<b>Apo AI</b>	134.0±19.5	140.5±19.5	135.2±20.2	0.007	138.1±19.3	140.7±16.5	138.5±23.5	ns	136.8±19.1	135.4±19.6	147.3±17.3	ns
<b>C-LDL</b>	108.5±27.4	109.3±27.6	98.3±22.3	ns	113.4±27.0	110.4±26.7	107.6±31.5	ns	108.9±24.0	103.6±25.0	115.5±29.2	ns
<b>Apo B</b>	70.9±16.2	73.2±14.9	62.4±12.3	ns	71.9±14.9	72.2±15.1	67.9±17.2	ns	70.0±13.4	66.1±13.3	78.6±19.0	ns
<b>TG</b>	72.3±23.1	77.0±25.3	69.4±22.6	ns	73.8±26.2	70.0±19.6	69.8±22.6	ns	75.3±28.1	71.6±20.8	79.4±24.0	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: t-test análisis comparando genotipos GG-GA.

**Tabla 12.** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* por terciles de ingesta diaria de grasa monoinsaturada (mg/día) en la población estudiada.

	TERCIL 1 (18.1-37.6) mg/día				TERCIL 2 (37.7-46.7) mg/día				TERCIL 3 (46.8-116.7) mg/día			
	GG (n=240)	GA (n=96)	AA (n=12)	P	GG (n=244)	GA (n=98)	AA (n=13)	P	GG (n=244)	GA (n=103)	AA (n=11)	P
<b>CT</b>	184.6±27.1	186.1±26.2	178.9±30.3	ns	184.6±30.7	184.4±34.8	191.4±56.4	ns	181.1±25.1	178.9±24.7	190.2±37.2	ns
<b>C-HDL</b>	57.8±12.9	59.8±11.8	60.4±10.3	ns	59.5±14.0	59.7±13.2	57.5±14.0	ns	58.1±12.9	60.4±13.8	64.2±12.9	ns
<b>Apo AI</b>	134.5±18.6	139.4±18.2	135.5±16.6	ns	137.5±21.2	139.6±18.0	138.3±24.5	ns	136.8±18.2	137.6±19.8	147.1±19.8	ns
<b>C-LDL</b>	112.0±26.8	111.0±23.7	105.2±25.0	ns	110.8±28.2	110.4±34.8	121.5±36.6	ns	107.8±23.6	104.3±25.1	111.0±36.4	ns
<b>Apo B</b>	72.1±16.0	72.1±13.5	66.4±13.0	ns	70.7±14.6	72.2±16.5	75.1±29.2	ns	70.0±14.0	67.3±13.8	74.6±23.1	ns
<b>TG</b>	73.6±23.6	76.3±25.3	66.0±15.4	ns	71.8±25.8	71.2±22.3	79.7±25.9	ns	75.9±27.9	70.7±17.7	74.7±26.3	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 13.** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* por terciles de ingesta diaria de grasa poliinsaturada (mg/día) en la población estudiada.

	TERCIL 1 (8.0-16.7) mg/día				TERCIL 2 (16.8-20.6) mg/día				TERCIL 3 (20.7-45.1) mg/día			
	GG (n=246)	GA (n=95)	AA (n=14)	P	GG (n=240)	GA (n=98)	AA (n=14)	P	GG (n=242)	GA (n=104)	AA (n=8)	P
<b>CT</b>	185.2±27.3	182.8±28.5	191.0±53.2	ns	181.9±27.2	185.2±24.9	178.6±31.6	ns	183.2±28.7	181.2±32.7	194.0±41.4	ns
<b>C-HDL</b>	57.3±13.0	58.8±13.6	59.2±11.7	ns	58.8±13.6	60.2±12.2	62.9±15.1	ns	59.3±13.2	60.8±13.1	59.5±9.4	ns
<b>Apo AI</b>	133.3±19.7	135.8±19.1	135.5±17.3	ns	137.4±19.3	141.4±17.5	145.0±25.9	ns	138.2±18.8	139.2±19.1	140.2±16.4	ns
<b>C-LDL</b>	113.1±25.8	108.7±27.0	117.4±58.5	ns	108.2±26.7	110.4±24.6	108.2±26.7	ns	109.2±26.2	106.4±32.7	119.4±38.1	ns
<b>Apo B</b>	72.6±15.4	70.7±13.9	72.7±26.9	ns	69.3±14.3	72.0±14.3	110.4±24.6	ns	70.8±14.8	68.8±15.9	77.1±22.7	ns
<b>TG</b>	74.1±23.6	75.8±26.5	71.6±19.7	ns	74.2±24.0	72.7±20.8	103.4±26.6	ns	73.1±29.7	69.8±18.0	75.3±21.2	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

### 3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO *MspI* SITUADO EN LA POSICIÓN 83 DEL INTRÓN 1 DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA AI (*MspI* +83 de *APOAI*)

#### 3.1. Frecuencias de los genotipos del polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI*

En la Tabla 14 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI*. Se han observado muy pocos casos de homocigosis para la mutación (menos de un 1% de la población) y una frecuencia del genotipo CT entorno al 7.5%. El alelo minoritario T presenta una frecuencia de aproximadamente un 4%.

**Tabla 14:** Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* en la población estudiada.

	TOTALES (n=1252)	NIÑOS (n=631)	NIÑAS (n=621)
CC	92.2% (1154)	91.9% (580)	92.4% (574)
CT	7.6% (96)	8.1% (51)	7.2% (45)
TT	0.2% (2)	0% (0)	3.0% (2)
C	96.0% (2404)	96% (1211)	96.1% (1193)
T	4.0% (100)	4.0% (51)	3.9% (49)

### 3.2. Influencia del polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* sobre los niveles plasmáticos de lípidos

En las Tablas 15, 16 y 17 se muestran los niveles plasmáticos de lípidos y apolipoproteínas para cada uno de los genotipos del polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* en la población total y por sexos. Dada la baja frecuencia de portadores de genotipo mutado TT que hemos observado en nuestra población, hemos agrupado a los portadores de genotipo CT y TT para realizar el análisis estadístico.

Al comparar los niveles de lípidos por genotipos del polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* (CC vs CT/TT) mediante un t-test no hemos observado diferencias significativas en los niveles medios de lípidos plasmáticos (Tabla 15, 16 y 17).

**Tabla 15:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* en la población estudiada.

	CC (n=1154)	CT/TT (n=98)
<b>CT</b>	182.9±27.7	180.3±24.3
<b>C-HDL</b>	59.5±13.3	58.4±10.9
<b>Apo AI</b>	137.0±19.1	137.4±16.5
<b>C-LDL</b>	108.8±26.3	107.7±23.3
<b>Apo B</b>	70.3±15.2	69.7±13.0
<b>TG</b>	72.8±26.4	70.8±21.1

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.



**Tabla 16:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* en niños.

	CC (n=580)	CT/TT (n=51)
<b>CT</b>	182.2±26.3	177.6±25.0
<b>C-HDL</b>	60.4±13.3	58.1±10.4
<b>Apo AI</b>	138.5±19.0	137.4±17.9
<b>C-LDL</b>	108.4±28.0	105.0±24.9
<b>Apo B</b>	69.3±15.1	68.6±14.0
<b>TG</b>	71.2±25.6	72.8±23.7

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 17:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* en niñas.

	CC (n=574)	CT/TT (n=47)
<b>CT</b>	183.5±28.9	183.1±23.4
<b>C-HDL</b>	58.7±13.3	58.8±11.5
<b>Apo AI</b>	135.5±19.2	137.5±15.1
<b>C-LDL</b>	110.0±27.1	110.6±21.3
<b>Apo B</b>	71.4±15.2	70.9±11.8
<b>TG</b>	74.5±27.2	68.6±17.9

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

### **3.3. Influencia de la dieta en el efecto del polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* sobre los niveles de lípidos plasmáticos**

De nuevo hemos estudiado el efecto de la ingesta de grasa en la relación que el polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* tiene con el perfil lipídico de nuestros niños. Al igual que en el caso del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* analizamos la influencia de la ingesta de grasa total, grasa saturada, monoinsaturada y poliinsaturada. Sin embargo, en este caso los datos obtenidos en relación a la modificación de la asociación del polimorfismo con el perfil lipídico en función de la ingesta diaria de grasa carecen de solidez estadística ya que dado el bajo porcentaje de portadores de la mutación observado en nuestra población, al dividir por terciles de ingesta de grasa el tamaño muestral no es suficiente para comparar portadores de la mutación y no portadores (datos no mostrados).

## **4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO *Taq IB* EN EL INTRÓN 1 DEL GEN DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE ÉSTERES DE COLESTEROL (*Taq IB* de *CETP*)**

### **4.1. Frecuencias del polimorfismo *Taq IB* de *CETP***

En la Tabla 18 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *Taq IB* de *CETP*. En la población del estudio hemos observado que el genotipo mayoritario es el B1B2 con una frecuencia del 47.6%, la frecuencia de homocigotos no mutados es del 38.7% y la frecuencia de homocigotos portadores de mutación es de un 14% aproximadamente. En nuestra población el alelo mutado B2 presenta una frecuencia de un 37%, aproximadamente.

**Tabla 18:** Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *Taq IB de CETP* en la población estudiada.

	TOTALES (n=1249)	NIÑOS (n=631)	NIÑAS (n=618)
<b>B1B1</b>	38.7% (483)	40.2% (254)	37.1% (229)
<b>B1B2</b>	47.6% (595)	46.3% (292)	49.0% (303)
<b>B2B2</b>	13.7% (171)	13.5% (85)	13.9% (86)
<b>B1</b>	62.5% (1561)	63.4% (800)	61.6% (761)
<b>B2</b>	37.5% (937)	36.6% (462)	38.4% (475)

#### 4.2. Influencia del polimorfismo *Taq IB de CETP* sobre los niveles plasmáticos de lípidos

En las Tablas 19, 20 y 21 se muestran los niveles de lípidos y apolipoproteínas plasmáticas en función de los distintos genotipos del polimorfismo *Taq IB de CETP* en el grupo total y por sexos.

En el total de la población se observa claramente que los niveles de C-HDL y Apo AI son significativamente más elevados en los portadores de alelo mutado B2 que en los que no son portadores de la mutación, observándose diferencias que incluso alcanzan una significación estadística  $p < 0.001$  entre los niveles de C-HDL de los homocigotos B2B2 y los que presentan los heterocigotos para la mutación (B1B2) o los que no presentan la mutación (B1B1). A su vez los portadores de la mutación en homocigosis (genotipo B2B2) presentan niveles de C-LDL significativamente más bajos que los homocigotos no mutados (B1B1) o los heterocigotos (B1B2).

**Tabla 19:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *Taq IB de CETP* en la población estudiada.

	<b>B1B1 (n=483)</b>	<b>B1B2 (n=595)</b>	<b>B2B2 (n=171)</b>	<b>P</b>
<b>CT</b>	181.9±26.7	184.5±30.1	181.4±26.5	ns
<b>C-HDL</b>	57.6±12.5	59.4±13.5	65.2±12.4	B1B1-B1B2* B1B1-B2B2*** B1B2-B2B2***
<b>Apo AI</b>	134.9±18.6	137.7±19.4	141.0±18.2	B1B1-B2B2**
<b>C-LDL</b>	109.8±26.1	110.4±28.4	102.2±24.8	B1B1-B2B2** B1B2-B2B2**
<b>Apo B</b>	70.6±14.5	70.7±15.4	67.7±13.8	ns
<b>TG</b>	72.6±27.8	73.4±25.9	69.5±20.7	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: ANOVA (Análisis Post Hoc: test-Tukey o T2 Tamhane) \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 para diferencias en los niveles de lípidos entre genotipos.

Al analizar niños y niñas por separado se observa que en el caso de los niños (Tabla 20), los niveles de C-HDL en los portadores del genotipo B2B2 son significativamente más altos respecto a los que presentan los heterocigotos para la mutación (B1B2) y los homocigotos no mutados (B1B1). En el grupo de los niños asimismo encontramos niveles de C-LDL y Apo B significativamente más bajos en los portadores del genotipo mutado B2B2 respecto a los niños que no son portadores del alelo mutado B2.

Como se muestra en la Tabla 21 las niñas portadoras de la mutación presentan niveles de C-HDL y Apo AI significativamente más elevados que las que no son portadoras de la mutación, observándose un claro incremento de estos niveles desde el genotipo B1B1 al genotipo B2B2 (56, 59 y 65 mg/dL para B1B1, B1B2 y B2B2 respectivamente, en el caso del C-HDL y 133, 136 y 140 mg/dL en Apo AI). Observamos además que las niñas portadoras de la mutación en

homocigosis (genotipo B2B2) presentan niveles más bajos de C-LDL sin llegar a alcanzar la significación estadística.

**Tabla 20:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *Taq IB de CETP* en niños.

	<b>B1B1 (n=254)</b>	<b>B1B2 (n=292)</b>	<b>B2B2 (n=85)</b>	<b>P</b>
<b>CT</b>	181.5±25.6	183.3±27.0	179.1±24.6	ns
<b>C-HDL</b>	59.0±13.3	59.8±12.8	65.0±12.4	B1B1-B2B2** B1B2-B2B2**
<b>Apo AI</b>	136.6±19.0	138.9±18.8	141.8±18.7	ns
<b>C-LDL</b>	108.4±25.5	108.9±25.7	99.9±22.5	B1B1-B2B2* B1B2-B2B2*
<b>Apo B</b>	69.9±14.5	69.7±15.2	65.5±12.5	B1B1-B2B2*
<b>TG</b>	70.7±28.1	72.3±23.5	69.1±23.3	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: ANOVA (Análisis Post Hoc: test-Tukey o T2 Tamhane) \*p<0.05, \*\*p<0.01 para diferencias en los niveles de lípidos entre genotipos.

**Tabla 21:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *Taq IB de CETP* en niñas.

	<b>B1B1 (n=229)</b>	<b>B1B2 (n=303)</b>	<b>B2B2 (n=86)</b>	<b>P</b>
<b>CT</b>	182.3±27.9	184.5±29.6	183.8±28.1	ns
<b>C-HDL</b>	56.1±11.4	59.0±14.1	65.3±12.5	B1B1-B1B2* B1B1-B2B2***
<b>Apo AI</b>	133.1±17.9	136.5±19.8	140.2±17.8	B1B1-B2B2**
<b>C-LDL</b>	111.3±26.7	110.7±26.8	104.6±26.9	ns
<b>Apo B</b>	71.5±14.6	71.8±15.4	70.0±14.7	ns
<b>TG</b>	74.7±27.5	74.5±28.0	69.8±18.0	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: ANOVA (Análisis Post Hoc: test-Tukey o T2 Tamhane) \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 para diferencias en los niveles de lípidos entre genotipos.

#### **4.3. Influencia del IMC en el efecto del polimorfismo *Taq IB de CETP* sobre los niveles de lípidos plasmáticos**

Dada la reconocida influencia del IMC sobre el efecto del polimorfismo *Taq IB de CETP* sobre el perfil lipídico hemos analizado dicha influencia en nuestra población en función de los distintos terciles de IMC, observándose las mismas tendencias descritas anteriormente con independencia de este factor (Tabla 22). En los tres terciles el genotipo mutado B2B2 se asocia con niveles de C-HDL significativamente más elevados en relación a los otros dos genotipos. De igual forma los niveles de Apo AI asociados al alelo B2 son más altos en los tres terciles de IMC. Asimismo encontramos que los niveles de C-LDL y la Apo B en los portadores de la mutación son más bajos observándose esta tendencia en los tres terciles.

**Tabla 22.** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos del polimorfismo *Taq IB de CETP* por terciles de IMC en la población estudiada.

	TERCIL 1 (8.9-15.6) Kg/m <sup>2</sup>				TERCIL 2 (15.7-17.4) Kg/m <sup>2</sup>				TERCIL 3 (17.5-29.0) Kg/m <sup>2</sup>			
	B1B1 (n=126)	B1B2 (n=159)	B2B2 (n=47)	P	B1B1 (n=128)	B1B2 (n=157)	B2B2 (n=44)	P	B1B1 (n=126)	B1B2 (n=157)	B2B2 (n=49)	P
<b>CT</b>	185.9±27.3	182.3±29.5	179.9±22.6	ns	182.0±25.8	185.3±28.0	186.2±30.0	ns	180.8±28.4	185.8±28.0	176.0±22.3	ns
<b>C-HDL</b>	57.1±12.5	60.0±13.2	65.3±11.8	B1B1-B2B2** B1B2-B2B2*	57.5±12.1	58.0±11.6	64.5±11.5	B1B1-B2B2** B1B2-B2B2**	56.8±12.6	57.5±14.3	63.9±13.4	B1B2-B2B2*
<b>Apo AI</b>	135.1±17.6	138.5±20.5	140.7±16.0	ns	134.6±18.8	135.3±18.7	145.2±18.2	B1B1-B2B2** B1B2-B2B2**	135.7±20.8	137.8±18.7	140.4±19.9	ns
<b>C-LDL</b>	114.8±27.0	108.1±26.9	100.8±20.1	B1B1-B2B2**	109.3±25.4	112.3±25.0	107.5±29.8	ns	108.9±27.2	113.0±27.1	97.5±20.7	B1B1-B2B2* B1B2-B2B2**
<b>Apo B</b>	72.2±15.4	69.6±15.1	64.2±12.3	B1B1-B2B2**	70.5±14.3	72.0±14.7	72.6±16.6	ns	70.3±14.6	72.6±14.4	65.5±10.6	B1B2-B2B2**
<b>TG</b>	70.1±17.5	70.7±24.9	69.0±17.8	ns	75.7±28.4	75.6±22.3	69.0±17.7	ns	75.1±27.1	77.0±31.2	72.6±20.3	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: ANOVA (Análisis Post Hoc: test-Tukey o T2 Tamhane) \*p<0.05, \*\*p<0.01 para diferencias en los niveles de lípidos entre genotipos.

## 5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO *PON192* EN EL EXÓN 6 DEL GEN DE LA PARAOXONASA 1 (*PON192* de *PON1*)

### 5.1. Frecuencias del polimorfismo *PON192* de *PON1*

En la Tabla 23 se muestran las frecuencias de los genotipos y de los alelos del polimorfismo *PON192* de la paraoxonasa 1 (*PON1*) en la población total y para niños y niñas por separado. En nuestra población encontramos un 49.4% de portadores del genotipo no mutado QQ, un 41.4% de heterocigotos QR y un 9.2% de homocigosis para la mutación. Se ha observado que en nuestra población el alelo mutado R presenta una frecuencia del 30% aproximadamente.

**Tabla 23:** Frecuencias genotípicas del polimorfismo *PON192* de *PON1* en la población estudiada.

	TOTALES (n=1254)	NIÑOS (n=632)	NIÑAS (n=622)
QQ	49.4% (619)	47.8% (302)	50.9% (317)
QR	41.4% (519)	42.1% (266)	40.7% (253)
RR	9.2% (116)	10.1% (64)	8.4% (52)
Q	70% (1757)	68.8% (870)	71.3% (887)
R	30% (751)	31.2% (394)	28.7% (357)



## 5.2. Influencia del polimorfismo *PON192 de PON1* sobre los niveles plasmáticos de lípidos

Los resultados del análisis de la influencia del polimorfismo *PON192 de PON1* sobre el perfil lipídico se muestran en las Tablas 24, 25 y 26.

Al estudiar el efecto del polimorfismo *PON192 de PON1* sobre los niveles de lípidos plasmáticos mediante un análisis ANOVA, ya sea en el total de la población (Tabla 24), como estudiando niños y niñas por separado (Tabla 25 y 26), no hemos observado diferencias significativas en ninguna de las variables bioquímicas estudiadas.

**Tabla 24:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *PON192 de PON1* en la población estudiada.

	QQ (n=619)	QR (n=519)	RR (n=116)
<b>CT</b>	182.8±28.5	182.7±26.9	182.4±24.6
<b>C-HDL</b>	59.6±12.9	59.1±13.5	60.4±13.0
<b>Apo AI</b>	136.8±18.9	137.1±18.5	138.2±21.8
<b>C-LDL</b>	108.7±26.6	108.8±26.0	108.5±24.1
<b>Apo B</b>	70.2±15.3	70.3±15.2	70.6±12.8
<b>TG</b>	71.7±25.4	74.9±27.6	67.5±21.5

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 25:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *PON192 de PON1* en niños.

	<b>QQ (n=302)</b>	<b>QR (n=266)</b>	<b>RR (n=64)</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	182.7±27.6	182.2±25.5	177.1±21.4
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	59.5±12.6	60.9±13.3	60.4±14.1
<b>Apo AI (mg/dL)</b>	136.6±18.7	140.3±18.0	138.7±22.6
<b>C-LDL (mg/dL)</b>	109.0±25.7	106.7±25.7	103.2±21.6
<b>Apo B (mg/dL)</b>	69.3±14.5	68.9±14.1	67.3±12.4
<b>TG (mg/dL)</b>	70.6±23.6	73.1±27.7	66.9±23.4

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 26:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *PON192 de PON1* en niñas.

	<b>QQ (n=317)</b>	<b>QR (n=253)</b>	<b>RR (n=52)</b>
<b>CT</b>	182.8±29.4	183.3±28.3	189.1±26.8
<b>C-HDL</b>	59.7±13.2	57.1±13.5	60.4±11.7
<b>Apo AI</b>	136.9±19.1	133.6±18.4	137.7±21.0
<b>C-LDL</b>	108.5±27.5	111.0±26.0	115.1±25.6
<b>Apo B</b>	71.2±16.0	71.0±14.1	74.6±12.4
<b>TG</b>	72.8±27.1	76.8±27.4	68.3±19.0

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

## 6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO *PON55* EN EL EXÓN 3 DEL GEN DE LA PARAOXONASA 1 (*PON55* de *PON1*)

### 6.1. Frecuencias de los genotipos del polimorfismo *PON55* de *PON1*

En la Tabla 27 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo *PON55* de *PON1* en la población total y por sexos. En nuestra población hay aproximadamente un 38% de homocigotos LL, un 47.4% de heterocigotos LM y un 14.5% de homocigotos para la mutación. El alelo mutado M está presente en aproximadamente un 38% de la población.

**Tabla 27:** Frecuencias genotípicas del polimorfismo *PON55* de *PON1* en la población estudiada.

	TOTALES (n=1255)	NIÑOS (n=633)	NIÑAS (n=622)
LL	38.1% (478)	39.7% (251)	36.4% (227)
LM	47.4% (595)	45.6% (289)	49.3% (306)
MM	14.5% (182)	14.7% (93)	14.3% (89)
L	61.8% (1551)	62.5% (791)	61.1% (760)
M	38.2% (959)	37.5% (475)	38.9% (484)

### 6.2. Influencia del polimorfismo *PON55* de *PON1* sobre los niveles plasmáticos de lípidos

Los resultados del análisis de los niveles de lípidos y apolipoproteínas en función del genotipo del polimorfismo *PON55* de *PON1* en la población total y en niños y niñas por separado se muestran en las Tablas 28, 29 y 30. Tanto en el análisis ANOVA en el grupo total como en el de niños y niñas por separado, no se

han encontrado diferencias significativas para ninguna de las variables lipídicas estudiadas en función del genotipo de este polimorfismo.

**Tabla 28:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *PON55 de PON1* en la población estudiada.

	<b>LL (n=478)</b>	<b>LM (n=595)</b>	<b>MM (n=182)</b>
<b>CT</b>	182.8±29.0	183.5±28.2	182.4±28.8
<b>C-HDL</b>	60.0±13.8	58.9±12.9	60.1±12.4
<b>Apo AI</b>	137.4±19.9	136.4±18.6	137.9±17.8
<b>C-LDL</b>	107.7±24.8	109.9±27.8	108.5±26.9
<b>Apo B</b>	69.7±13.9	70.9±15.4	69.3±24.7
<b>TG</b>	90.9±7.9	90.3±12.2	91.4±11.4

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 29:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *PON55 de PON1* en niños.

	<b>LL (n=251)</b>	<b>LM (n=289)</b>	<b>MM (n=93)</b>
<b>CT</b>	181.8±25.2	181.5±27.1	183.8±25.8
<b>C-HDL</b>	60.6±13.4	60.0±13.3	59.6±11.5
<b>Apo AI</b>	139.0±19.7	138.1±18.4	137.5±18.2
<b>C-LDL</b>	106.5±23.8	107.8±29.2	110.9±23.3
<b>Apo B</b>	68.3±13.4	69.4±15.1	68.5±13.6
<b>TG</b>	73.0±29.0	71.3±23.0	66.5±21.6

Los valores corresponden a media ± desviación estándar

**Tabla 30:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *PON55* de *PON1* en niñas.

	LL (n=227)	LM (n=306)	MM (n=89)
<b>CT</b>	182.6±29.3	184.9±27.4	181.1±31.7
<b>C-HDL</b>	59.3±14.1	57.8±12.5	60.5±13.4
<b>Apo AI</b>	135.7±20.1	134.8±18.6	138.4±17.4
<b>C-LDL</b>	109.1±25.9	111.9±26.3	106.1±30.2
<b>Apo B</b>	70.7±14.3	72.3±15.5	70.1±14.9
<b>TG</b>	71.5±22.0	76.5±29.4	72.2±27.4

Los valores corresponden a media ± desviación estándar

En el estudio del efecto de los polimorfismos *PON192* y *PON55* de la paraoxonasa 1 sobre el perfil lipídico en otras poblaciones, se ha descrito la existencia de variables confundentes como la dieta y el ejercicio físico. En nuestra población hemos analizado la influencia de la dieta evaluando la relación de los polimorfismos *PON192* y *PON55* con el perfil lipídico en función de la ingesta diaria de grasa total, saturada, monoinsaturada y poliinsaturada por terciles, sin encontrar diferencias significativas entre los genotipos de los polimorfismos *PON192* y *PON55* sobre los lípidos plasmáticos en ninguno de los terciles (datos no mostrados). Respecto al ejercicio físico lamentablemente no disponemos de este dato para evaluar su influencia en el perfil lipídico de nuestros niños en función del genotipo de los polimorfismos de *PON1* estudiados.

## 7. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO *R219K*, EN EL EXÓN 7 DEL GEN DEL TRANSPORTADOR ABCA1 (*R219K de ABCA1*)

### 7.1. Frecuencias de los genotipos del polimorfismo *R219K de ABCA1*

En la Tabla 31 se muestran las frecuencias de los genotipos y de los alelos para el polimorfismo *R219K de ABCA1* en la población total y en niños y niñas por separado. Se observa una frecuencia de 49.6% para el genotipo RR, un 42.9% de portadores heterocigotos y un 7.5% de homocigotos para la mutación (genotipo KK). Al analizar las frecuencias alélicas observamos que el alelo K mutado aparece en aproximadamente un 29% de nuestra población.

**Tabla 31:** Frecuencias genotípicas del polimorfismo *R219K de ABCA1* en la población estudiada.

	TOTALES (n=1255)	NIÑOS (n=633)	NIÑAS (n=622)
<b>RR</b>	49.6% (622)	46.9% (297)	52.3% (325)
<b>RK</b>	42.9% (539)	45.6% (289)	40.2% (250)
<b>KK</b>	7.5% (94)	7.5% (47)	7.6% (47)
<b>R</b>	71% (1783)	69.7% (883)	72.3% (900)
<b>K</b>	29% (727)	30.3% (383)	27.7% (344)

## 7.2. Influencia del polimorfismo *R219K* de *ABCA1* sobre los niveles plasmáticos de lípidos

Los niveles plasmáticos de lípidos y apolipoproteínas para el polimorfismo *R219K* de *ABCA1* en la población total y en niños y niñas por separado se muestran en las Tablas 32, 33, 34. Para realizar el análisis estadístico hemos agrupado a los portadores de la mutación (genotipos RK y KK).

Al comparar los niveles de lípidos plasmáticos según el genotipo del polimorfismo *R219K* de *ABCA1* mediante un análisis t-test, no se observan diferencias significativas entre los genotipos de este polimorfismo para los parámetros bioquímicos analizados ni en el grupo total (Tabla 32), ni al estudiar la población segregándola por sexo (Tabla 33 y Tabla 34).

**Tabla 32:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *R219K* de *ABCA1* en la población estudiada.

	<b>RR (n=622)</b>	<b>RK/KK (n=633)</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	181.9±27.7	183.3±27.1
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	59.2±13.9	59.7±12.4
<b>Apo AI (mg/dL)</b>	136.3±18.8	137.6±19.1
<b>C-LDL (mg/dL)</b>	108.3±27.5	109.4±25.6
<b>Apo B (mg/dL)</b>	70.0±15.1	70.4±14.4
<b>TG (mg/dL)</b>	73.6±28.3	71.6±23.6

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 33:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *R219K de ABCA1* en niños.

	<b>RR (n=297)</b>	<b>RK/ KK (n=336)</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	180.6±27.4	183.0±25.1
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	59.1±13.4	61.0±12.7
<b>Apo AI (mg/dL)</b>	137.0±18.9	139.4±18.8
<b>C-LDL (mg/dL)</b>	106.7±26.0	108.1±24.8
<b>Apo B (mg/dL)</b>	69.0±15.5	69.2±13.6
<b>TG (mg/dL)</b>	73.3±28.4	69.3±22.2

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

**Tabla 34:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *R219K de ABCA1* en niñas.

	<b>RR (n=325)</b>	<b>RK/ KK (n=297)</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	183.0±27.9	183.7±29.2
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	59.1±14.4	58.2±11.8
<b>Apo AI (mg/dL)</b>	135.6±18.8	135.6±19.4
<b>C-LDL (mg/dL)</b>	109.1±26.6	110.7±26.6
<b>Apo B (mg/dL)</b>	71.0±14.8	71.9±15.0
<b>TG (mg/dL)</b>	73.9±28.2	74.1±24.9

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.



## 8. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO *V771M* EN EL EXÓN 16 DEL GEN DEL TRANSPORTADOR *ABCA1* (*V771M de ABCA1*)

### 8.1. Frecuencias de los genotipos del polimorfismo *V771M de ABCA1*

El análisis de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *V771M de ABCA1* se muestra en la Tabla 35. Observamos que existen aproximadamente un 92% de homocigotos VV en nuestra población, un 7% de heterocigotos y únicamente 9 portadores de genotipo mutado MM, que suponen menos del 1% de la población estudiada. En cuanto a las frecuencias alélicas, el alelo mutado M aparece en un 4.3% de la población.

**Tabla 35:** Frecuencias genotípicas del polimorfismo *V771M de ABCA1* en la población estudiada.

	TOTALES (n=1255)	NIÑOS (n=633)	NIÑAS (n=622)
<b>VV</b>	92.1% (1156)	92.1% (583)	92.1% (573)
<b>VM</b>	7.2% (90)	7.1% (45)	7.2% (45)
<b>MM</b>	0.7% (9)	0.8% (5)	0.6% (4)
<b>V</b>	95.7% (2402)	95.6% (1211)	95.7% (1191)
<b>M</b>	4.3% (108)	4.4% (55)	4.6% (53)

## 8.2. Influencia del polimorfismo *V771M* de *ABCA1* sobre los niveles plasmáticos de lípidos

En las Tablas 36, 37 y 38 se muestran los niveles plasmáticos de lípidos y apolipoproteínas en función del genotipo del polimorfismo *V771M* de *ABCA1*. Dada la baja frecuencia del genotipo MM en nuestra población, hemos agrupado a los portadores del alelo M (VM/MM) para realizar el análisis estadístico.

En el total de la población (Tabla 36), al realizar un análisis t-test no se observan diferencias significativas en función de los genotipos del polimorfismo *V771M* de *ABCA1* en ninguna de las variables bioquímicas analizadas.

**Tabla 36:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *V771M* de *ABCA1* en la población estudiada.

	VV (n=1156)	VM/MM (n=99)
CT (mg/dL)	182.7±27.9	184.9±30.0
C-HDL (mg/dL)	59.3±13.1	61.6±13.7
Apo AI (mg/dL)	136.8±19.1	139.4±17.8
C-LDL (mg/dL)	108.8±26.6	109.7±28.2
Apo B (mg/dL)	70.4±15.0	69.4±15.2
TG (mg/dL)	73.0±26.4	68.5±20.9

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

Al analizar la población de niños y niñas (Tabla 37 y 38) por separado observamos que, únicamente en el caso de los niños (Tabla 37) existen diferencias significativas en los niveles de C-HDL, siendo éstos niveles más elevados en los portadores de los genotipos VM/MM respecto a los

homocigotos no mutados VV. En este análisis no encontramos diferencias significativas en el resto de las variables bioquímicas estudiadas.

**Tabla 37:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *V771M de ABCA1* en niños.

	VV (n=583)	VM/MM (n=50)	P
CT (mg/dL)	182.0±27.4	187.5±30.0	ns
C-HDL (mg/dL)	59.8±12.8	64.8±15.1**	0.008
Apo AI (mg/dL)	138.0±18.9	141.8±18.6	ns
C-LDL (mg/dL)	107.8±26.6	109.4±29.5	ns
Apo B (mg/dL)	69.3±14.8	68.5±15.5	ns
TG (mg/dL)	71.6±25.6	67.1±22.5	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: análisis t-test \*\*p<0.01 para diferencias en los niveles de lípidos entre VV y VM/MM.

**Tabla 38:** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos para el polimorfismo *V771M de ABCA1* en niñas.

	VV (n=573)	VM/MM (n=49)
CT (mg/dL)	183.4±28.4	182.2±30.2
C-HDL (mg/dL)	58.7±13.4	58.3±11.2
Apo AI (mg/dL)	135.5±19.2	136.8±16.7
C-LDL (mg/dL)	109.9±26.6	109.9±27.2
Apo B (mg/dL)	71.5±15.1	69.3±13.7
TG (mg/dL)	74.4±27.2	70.0±19.3

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

### 8.3. Influencia del IMC y los niveles de DHEA-S en el efecto del polimorfismo *R219K* y *V771M* de *ABCA1* sobre los niveles de lípidos plasmáticos

Se sabe que el efecto de estos polimorfismos de *ABCA1* sobre el perfil lipídico puede estar modulado por factores ambientales como el IMC. Además dado que en nuestra población el polimorfismo *V771M* de *ABCA1* tiene efecto en niños y no en niñas y que sabemos que los niveles de hormona dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) son diferentes entre niños y niñas, nos hemos planteado una posible influencia de los diferentes niveles de esta hormona. Los resultados obtenidos analizando la influencia del IMC y de los niveles de la hormona DHEA-S por terciles no nos permiten afirmar la existencia de influencia en función de los terciles de estas variables ya que, dada la baja frecuencia del polimorfismo *V771* de *ABCA1* observada en nuestra población, el tamaño de la muestra de portadores de la mutación disminuía de forma importante al dividir por terciles y los resultados carecían de solidez estadística (datos no mostrados).

En el caso de la variante *R219K* de *ABCA1* hemos observado que en el tercil más alto de IMC (Tabla 39) los portadores de la mutación (genotipo RK o KK) presentaban niveles de Apo AI significativamente más elevados que los no portadores (genotipo RR). Respecto a influencia de los niveles de DHEA-S en la relación del polimorfismo *R219K* de *ABCA1* sobre el perfil lipídico (Tabla 40 y 41). Hemos observado que en el grupo de los niños (Tabla 40), los portadores de este polimorfismo con niveles más bajos de la hormona DHEA-S presentaban niveles de C-HDL y Apo AI claramente más elevados.

**Tabla 39.** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos del polimorfismo R219K de ABCA1 por terciles de IMC (Kg/m<sup>2</sup>) en la población estudiada.

	TERCIL 1 (8.9-16.0)Kg/m <sup>2</sup>			TERCIL 2 (15.7-17.4)Kg/m <sup>2</sup>			TERCIL 3 (17.5-29.0)Kg/m <sup>2</sup>		
	RR (n=162)	RK/KK (n=15.6)	P	RR (n=167)	RK/KK (n=168)	P	RR (n=161)	RK/KK (n=172)	P
<b>CT</b>	182.2±28.6	183.5±24.8	ns	182.4±26.9	183.8±28.9	ns	182.4±29.2	184.9±26.6	ns
<b>C-HDL</b>	58.7±12.7	58.9±12.4	ns	59.8±13.7	59.4±12.2	ns	56.9±14.1	58.7±12.3	ns
<b>Apo AI</b>	135.7±19.1	136.1±17.7	ns	137.9±18.4	139.7±19.9	ns	133.6±18.3	138.5±20.7	0.023
<b>C-LDL</b>	108.7±26.5	110.3±24.6	ns	108.4±26.7	110.5±28.7	ns	110.0±27.2	110.6±23.6	ns
<b>Apo B</b>	70.1±14.9	70.7±14.0	ns	70.2±14.4	70.7±15.6	ns	70.6±15.7	71.3±13.8	ns
<b>TG</b>	74.4±30.7	71.8±23.2	ns	70.4±20.9	69.8±19.9	ns	77.1±26.5	77.8±25.9	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: t-test \*p<0.05 para diferencias en los niveles de lípidos entre genotipos.

**Tabla 40.** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos del polimorfismo R219K de ABCA1 por terciles de DHEA-S (µg/dL) en niños.

	TERCIL 1 (0.9-14.8)µg/dL			TERCIL 2 (14.9-32.9)µg/dL			TERCIL 3 (33.1-302.5)µg/dL		
	RR (n=85)	RK/KK (n=99)	P	RR (n=84)	RK/KK (n=98)	P	RR (n=83)	RK/KK (n=101)	P
<b>CT</b>	181.3±22.5	183.5±23.7	ns	184.0±29.4	181.6±25.8	ns	180.1±30.4	186.6±25.8	ns
<b>C-HDL</b>	58.0±11.9	62.6±13.1	0.016	60.3±13.5	59.5±13.8	ns	58.7±15.1	59.7±11.5	ns
<b>Apo AI</b>	135.6±14.8	142.3±19.3	0.009	139.4±20.1	138.0±20.0	ns	136.8±21.2	139.1±17.1	ns
<b>C-LDL</b>	107.9±24.2	106.9±23.8	ns	109.8±26.4	108.8±25.5	ns	106.0±28.5	112.8±24.8	ns
<b>Apo B</b>	69.0±13.8	69.0±13.1	ns	69.8±15.0	68.8±14.1	ns	67.5±15.2	70.5±14.2	ns
<b>TG</b>	75.2±37.5	70.1±23.6	ns	69.4±23.1	67.1±21.3	ns	76.9±26.5	70.7±22.1	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

p: t-test \*p<0.05, \*\*p<0.01 para diferencias en los niveles de lípidos entre genotipos.

**Tabla 41.** Niveles de lípidos (mg/dL) según genotipos del polimorfismo R219K de ABCA1 por terciles de DHEA-S (µg/dL) en niñas.

	TERCIL 1 (0.3-17.0)µg/dL			TERCIL 2 (17.1-36.2)µg/dL			TERCIL 3 (36.3-372.0)µg/dL		
	RR (n=102)	RK/KK (n=75)	P	RR (n=94)	RK/KK (n=85)	P	RR (n=87)	RK/KK (n=91)	P
<b>CT</b>	185.6±29.0	182.7±31.6	ns	180.5±23.7	182.1±23.4	ns	187.4±29.0	187.4±28.2	ns
<b>C-HDL</b>	59.8±13.1	62.6±13.1	ns	58.5±12.6	56.0±10.1	ns	58.8±16.9	59.5±11.4	ns
<b>Apo AI</b>	137.2±19.7	134.8±20.1	ns	136.9±17.7	134.6±17.9	ns	134.7±18.6	137.9±17.9	ns
<b>C-LDL</b>	111.9±24.9	110.1±27.3	ns	106.9±21.5	111.2±22.6	ns	113.8±30.2	113.2±27.3	ns
<b>Apo B</b>	72.2±14.8	72.2±15.7	ns	68.2±12.8	72.1±12.6	ns	73.1±16.7	71.8±14.4	ns
<b>TG</b>	69.6±21.4	73.2±26.6	ns	75.4±23.4	74.1±23.9	ns	73.9±23.8	73.6±24.4	ns

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

*DISCUSIÓN*



Los niveles plasmáticos de C-HDL en España son más elevados que los descritos en otros países tanto en la edad adulta <sup>207</sup> como en la infancia <sup>31</sup>. En un editorial de 1998 <sup>208</sup> el Prof. de Oya, refiriéndose a la baja mortalidad cardiovascular observada en España a pesar de la presencia de múltiples factores de riesgo, hace referencia a los elevados niveles de C-HDL descritos en el estudio NICAM, en el que se muestra que los niños de la Comunidad de Madrid presentan un C-HDL claramente más elevado que los niños norteamericanos <sup>30</sup> y opina que este hecho puede estar contribuyendo a la baja mortalidad cardiovascular en nuestro país <sup>208</sup>. El Estudio Cuatro Provincias (Estudio 4P) corrobora a su vez los elevados niveles de C-HDL observados en los niños españoles <sup>209</sup>, y nos ha permitido concluir mediante el análisis comparativo de los datos de estos dos estudios la persistencia en el tiempo de dichos niveles, a pesar del aumento gradual que se ha observado en los niveles de CT y C-LDL <sup>31</sup>.

Sin embargo los factores responsables de éstos elevados niveles de C-HDL permanecen sin aclarar. Se sabe que factores externos como el sexo, la edad, el IMC, la dieta, el alcohol, el tabaco o el ejercicio físico, modifican los niveles de estas lipoproteínas <sup>210</sup>, estableciéndose que los niveles plasmáticos de C-HDL son el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales <sup>102</sup>. En este sentido en la población prepuberal del Estudio 4P se han analizado algunos de estos factores ambientales que podrían influir en el perfil lipídico y en particular en el C-HDL. En relación con la dieta se demostró que una mayor variedad en la misma iba acompañada de niveles de C-HDL más altos <sup>211</sup> observándose que la dieta en la población estudiada era aceptable en cuanto a variedad y diversidad <sup>212</sup>,

a pesar de que únicamente un 3% de los niños cumplía totalmente las recomendaciones de ingesta de macronutrientes<sup>213</sup>. Respecto a la asociación de la ingesta de grasa con el C-HDL, los niños que estaban en el quintil de menor ingesta de grasa saturada no presentaban niveles de C-HDL muy diferentes respecto a los que presentaban la ingesta de grasa saturada más alta<sup>214</sup>. Por otro lado nuestra población cumple la ingesta recomendada de micronutrientes como vitaminas y minerales antioxidantes e incluso supera los niveles recomendados en todos los casos salvo en el de la vitamina B<sub>6</sub><sup>213</sup>, observándose que el C-HDL correlaciona de forma positiva con todas las vitaminas liposolubles estudiadas ( $\alpha$  y  $\gamma$  tocoferol, licopeno,  $\alpha$  y  $\beta$  caroteno y retinol) excepto con el  $\gamma$  tocoferol<sup>215</sup>.

En nuestra población la correlación del IMC con el C-HDL no es tan evidente, ya que la correlación entre el IMC y los niveles plasmáticos de C-HDL o Apo AI se observa únicamente en el tercil más alto de DHEA-S<sup>216</sup>. Aunque sí se ha observado que en niños obesos los niveles de C-HDL eran claramente inferiores que en los no obesos y que las niñas obesas presentaban niveles significativamente más bajos tanto de C-HDL como de Apo AI<sup>217</sup>, en el caso de los niños con sobrepeso únicamente los que se encontraban en el tercil más elevado de DHEA-S presentaban niveles de C-HDL y Apo AI sensiblemente más bajos, asociándose por tanto con un perfil lipídico menos favorable<sup>216</sup>.

Lamentablemente en el primer corte del estudio desconocemos la actividad física que desarrollaban los niños y no hemos podido evaluar su efecto sobre el perfil lipídico.

En este contexto el objetivo de esta tesis ha sido analizar si los determinantes genéticos están contribuyendo al perfil lipídico y en particular a los niveles plasmáticos de C-HDL en nuestros niños. Para ello hemos seleccionado en

nuestro estudio aquellos polimorfismos que de forma más consistente se han asociado con niveles plasmáticos de C-HDL en otras poblaciones, ya sea de forma directa o modulados por factores ambientales. El análisis de polimorfismos genéticos en los genes de la apolipoproteína AI, la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), la enzima paraoxonasa 1 y de la proteína transportadora ABCA1 puede ayudarnos a conocer mejor el origen de los elevados niveles de C-HDL que presenta la población infantil española y de su persistencia en el tiempo.

### **Polimorfismos en el gen *APOAI* y niveles plasmáticos de lípidos**

La apolipoproteína AI es el componente principal de las partículas HDL y participa de forma fundamental en el transporte reverso de colesterol <sup>218</sup>. El estudio de las alteraciones genéticas de esta apolipoproteína ha puesto de manifiesto la asociación de algunas de estas variantes de Apo AI con niveles alterados de C-HDL <sup>219 96 18</sup>. Entre los polimorfismos del gen de *APOAI* más comúnmente estudiados en relación a los niveles plasmáticos de lípidos se encuentran los polimorfismos *MspI* en posición -75 de la región promotora y *MspI* en posición +83 del intrón 1 del gen *APOAI* <sup>220 221 222</sup>.

En nuestro estudio hemos observado que aproximadamente un 31% de los niños son portadores del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI*, (genotipo GA o AA). Esta frecuencia es muy similar a la observada por López-Miranda et al <sup>127</sup> también en población española con una frecuencia del polimorfismo del 28% aproximadamente o por de Franca et al <sup>223</sup> en población brasileña que describen una frecuencia de estos genotipos del 33% y Larson et al <sup>222</sup> que observan una frecuencia de individuos portadores de la mutación entorno al 27% en población

norteamericana. Respecto a la población oriental Akita et al <sup>224</sup> en población japonesa describen una frecuencia de genotipos GA y AA cercana al 30% mientras que Ma et al <sup>225</sup> sin embargo describe una frecuencia del 52% en China, frecuencia que resulta claramente superior a la observada en población caucásica como la nuestra.

Por el contrario la frecuencia del polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* es muy baja. En nuestra población la frecuencia de portadores del alelo T de esta variante genética es de aproximadamente el 4%. Este dato concuerda con lo descrito por Wang et al <sup>226</sup> en población caucásica australiana y por Xu et al <sup>227</sup> para población europea, ya que en ambos casos presentan frecuencias del alelo mutado T entorno al 4%. En población china se ha descrito una frecuencia de esta variante genética similar a la descrita en nuestros niños <sup>228</sup>. Como vemos, y aunque existen otras poblaciones como la brasileña <sup>223</sup>, japonesa <sup>229</sup> y africana <sup>230</sup> con una frecuencia mayor de individuos portadores del alelo T, entorno al 11%, 23% y 40%, respectivamente, el polimorfismo *MspI* +83 de *APOAI* es muy poco frecuente en población caucásica. La relación de este polimorfismo de *APOAI* con los niveles de lípidos es controvertida, ya que aunque hay autores que han descrito su asociación con niveles plasmáticos de C-HDL y Apo AI elevados <sup>125 222</sup>, otros autores no han observado que este polimorfismo este relacionado con cambios relevantes en el perfil lipídico <sup>223 228</sup>. Al igual que en estos trabajos en nuestros niños no hemos observado asociación de este polimorfismo con los lípidos plasmáticos y al evaluar la influencia de la dieta en esta asociación hemos encontrado que los resultados carecen de solidez estadística, ya que como venimos comentando, la frecuencia de portadores de la mutación en nuestros niños es muy baja al igual que en el resto de poblaciones caucásicas <sup>226</sup> y al dividir

la población por terciles de ingesta de grasa el tamaño de la muestra se reduce considerablemente. En general la baja frecuencia de este polimorfismo puede explicar que los resultados entre estudios resulten discrepantes ya que puede ocurrir que el tamaño muestral de estos trabajos no sea suficiente para sacar conclusiones.

La asociación del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* con los niveles de lípidos se ha analizado en numerosas ocasiones. En nuestra población no hemos observado diferencias en los niveles de lípidos plasmáticos entre genotipos para el polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* ni en los niños ni en las niñas. Jeenah et al <sup>220</sup> si describen que el alelo A del polimorfismo se asocia con niveles elevados de C-HDL y Apo AI en hombres y Pagani et al <sup>231</sup> demuestran dicha asociación en mujeres italianas. Asimismo Paul-Hayase et al <sup>201</sup> confirman la asociación del polimorfismo con niveles de C-HDL elevados en población masculina belga y Minnich et al <sup>232</sup> en mujeres francocanadienses. Sin embargo esta asociación no se ha observado en población española adulta <sup>233</sup>, población en la que por otra parte se ha descrito que la relación del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* con el perfil lipídico se ve modificada por la ingesta de grasa saturada <sup>128</sup>.

En los últimos años el estudio de interacciones gen-dieta en relación con las concentraciones plasmáticas de lípidos ha adquirido singular importancia <sup>234</sup> <sup>235</sup>, ya que aunque se ha demostrado que una dieta baja en grasa disminuye los niveles de colesterol plasmático, existen grandes diferencias interindividuales en los niveles plasmáticos de lípidos en respuesta a la ingesta de colesterol <sup>236</sup> <sup>237</sup> y grasa saturada <sup>238</sup>, que sugieren la existencia de una importante influencia genética en esa diferente respuesta a la dieta. En un estudio realizado en hermanos gemelos, Destrés et al <sup>239</sup> comprueba que la respuesta de los niveles de lípidos

plasmáticos de C-HDL ante modificaciones de la dieta está determinada genéticamente. Más recientemente otros estudios han demostrado que un importante número de SNPs modulan la respuesta individual a la ingesta de grasa y colesterol, probando que las interacciones gen-dieta determinan las variaciones en los niveles plasmáticos de lípidos <sup>238 234</sup>.

En relación a la influencia de la dieta sobre el polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI*, Mata et al <sup>128</sup> observaron, en un estudio de intervención, que las mujeres portadoras del polimorfismo respondían de forma diferente ante modificaciones en la ingesta de grasa, así ante una dieta rica en grasa poliinsaturada las portadoras del alelo A experimentaban un descenso significativo de los niveles de CT y C-LDL respecto a las que no eran portadoras de la mutación. También en la población de mujeres del estudio Framingham, al analizar la influencia de la ingesta de grasa sobre los niveles plasmáticos de C-HDL, se observó un efecto distinto del polimorfismo sobre los niveles de C-HDL en función de la distinta ingesta de grasa poliinsaturada. Así las mujeres portadoras del alelo mutado A presentaban niveles de C-HDL un 13% más elevados respecto a las portadoras del genotipo GG cuando la ingesta de grasa poliinsaturada era elevada (>8%) y cuando la ingesta de grasa poliinsaturada era anormalmente baja (<4%), las portadoras del genotipo homocigoto GG presentaban niveles de C-HDL un 14% más altos respecto a las portadoras de la mutación <sup>240</sup>. López-Miranda et al <sup>127</sup> evaluaron la influencia de la ingesta de grasa monoinsaturada en el efecto del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* sobre el perfil lipídico, observando que los niveles plasmáticos de C-LDL de los portadores del polimorfismo experimentaban un aumento significativo después de una dieta rica en grasa monoinsaturada.

En nuestro estudio analizando el efecto de los polimorfismos *MspI* -75 y +83 de *APOAI* sobre el perfil lipídico en función a la ingesta de grasa total, saturada, monoinsaturada y poliinsaturada en mg/día, hemos observado que la ingesta de grasa total y saturada condiciona el efecto de la variante *MspI* -75 sobre los niveles plasmáticos de Apo AI ya que únicamente cuando la ingesta de grasa es baja, ya sea total o saturada, los niveles de Apo AI son claramente más elevados en los portadores de la mutación.

Estudios in vitro han demostrado que el alelo A del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI* tiene un efecto directo sobre la expresión de Apo AI que supone un aumento de la actividad del promotor<sup>241 242</sup> que algunos autores han relacionado con la diferente respuesta de los portadores de la mutación a la grasa de la dieta. Angotti et al<sup>243</sup> a su vez refieren un incremento de la transcripción asociado al alelo A del polimorfismo de entre 5 y 7 veces sugiriendo que este aumento va acompañado de menor afinidad por un receptor nuclear que se traduce en aumento de la eficacia de la transcripción en el promotor del gen *APOAI*, no obstante otros autores han descrito lo contrario<sup>241 220</sup>.

Lo interesante en nuestro estudio es que estamos observando diferencias entre genotipos solo cuando la ingesta de grasa es baja. En este sentido en la población prepuberal del Estudio 4P se demostró como la ingesta diaria de colesterol y grasa saturada modulaba el efecto de los polimorfismos de los transportadores ABCG5 y ABCG8, implicados en la absorción de colesterol, en la misma línea que en el caso del polimorfismo *MspI* -75 de *APOAI*. Así en el caso del polimorfismo *ABCG8*, su efecto sobre el perfil lipídico sólo se observaba en los niños que cumplían las recomendaciones dietéticas respecto a la ingesta de colesterol (ingesta diaria menor de 300mg/día), y en el caso del polimorfismo

*ABCG5* sólo se observaban diferencias entre genotipos cuando la ingesta diaria de grasa saturada era baja <sup>244</sup>.

### **Polimorfismos en el gen *CETP* y niveles plasmáticos de lípidos**

La proteína transportadora de ésteres de colesterol (*CETP*) participa de forma decisiva en el transporte de lípidos y en la modulación de los niveles de C-HDL <sup>72 245</sup>. En este sentido se ha demostrado que el estudio de variantes genéticas de esta proteína puede ayudar a conocer mejor su implicación en el metabolismo lipídico y en concreto su relación con el C-HDL. El polimorfismo más comúnmente estudiado en este ámbito es la variante *Taq IB*, localizada en el intrón 1 del gen y cuya asociación con niveles elevados de C-HDL y Apo AI ha sido ampliamente constatada <sup>246 160 162</sup>.

El polimorfismo *Taq IB de CETP* en nuestra población presenta una frecuencia muy elevada, ya que el 61% de los niños son portadores de la mutación (genotipo B1B2 o B2B2). Esta frecuencia es muy similar a la descrita por otros autores: Corella et al <sup>247</sup> en población española sana describen un 56% de portadores de al menos un alelo mutado, Cuchel et al <sup>248</sup> en población caucásica de EEUU un 67% de portadores de los genotipos B1B2 o B2B2, Brousseau et al <sup>160</sup> en población blanca norteamericana un 65% y Arai et al <sup>249</sup> y Sy et al <sup>250</sup> muestran unas frecuencias de este polimorfismo también entorno al 60-65% en población oriental de Japón y Filipinas, respectivamente. En el caso de la población afroamericana en el estudio de Cuchel et al <sup>248</sup> anteriormente mencionado se describe una frecuencia de este polimorfismo de un 44% aproximadamente, frecuencia que es idéntica a la descrita en población turca <sup>251</sup> y que resulta claramente inferior a la descrita para población caucásica y oriental <sup>248</sup>



<sup>249</sup>. Como se puede observar el polimorfismo *Taq IB de CETP* es muy frecuente en nuestra población, y en general en población caucásica.

En la población prepuberal del Estudio 4P hemos observado un claro efecto de este polimorfismo sobre los niveles plasmáticos de lípidos tanto en niños como en niñas. Observamos niveles de C-HDL y Apo AI significativamente más elevados en los portadores de la mutación alcanzándose incluso una potencia estadística  $p < 0.001$  en el caso del C-HDL. Existen numerosos estudios realizados en población adulta que han puesto de manifiesto la relación del polimorfismo *Taq IB de CETP* con niveles elevados de C-HDL y Apo AI. Al igual que lo observado en nuestro estudio en población infantil, en población española adulta también se ha observado niveles de C-HDL más altos en los portadores del alelo B2 de esta variante genética <sup>247</sup>. Gudnason et al <sup>252</sup> en población europea e Ikewaki et al <sup>253</sup> en población japonesa también describen la asociación del alelo B2 con niveles de C-HDL y Apo AI significativamente más elevados y de igual forma Brousseau et al <sup>160</sup> en población masculina norteamericana y Ordovás et al <sup>157</sup> en población del Estudio Framingham observan niveles de C-HDL más elevados en los portadores del polimorfismo, haciendo referencia además a su asociación con menor riesgo de EC. Llama la atención que en población turca, que se caracteriza por tener niveles de C-HDL bajos, los portadores del alelo B2 en homocigosis presentan una concentración de C-HDL entre un 8 y un 9% mayor que los no portadores <sup>251</sup>, encontrándose una frecuencia de la mutación cercana al 44% (alelo B2). A pesar de la falta de estudios en población infantil en una población vietnamita de edad similar a la nuestra se ha observado la misma tendencia que en nuestro estudio, encontrándose niveles de C-HDL significativamente más elevados en los portadores de la mutación <sup>254</sup>.

En nuestra población el polimorfismo *Taq IB de CETP* se asocia también con niveles de C-LDL y Apo B significativamente más bajos. En la literatura existen algunas referencias acerca de la influencia de esta variante genética sobre los niveles de C-LDL y Apo B. Así en un estudio de población masculina con una edad comprendida entre los 18 y los 28 años, procedente de 11 países europeos, Gudnason et al <sup>252</sup> describen niveles de C-LDL un 5% menores y un cociente LDL/HDL más favorable en portadores del polimorfismo. Ordovás et al <sup>157</sup> en población masculina del estudio Framingham encuentran a su vez niveles más bajos de la fracción pequeña de LDL en portadores de la mutación.

El mecanismo por el cual el polimorfismo *Taq IB de CETP* influye en los niveles de C-HDL no se conoce. Algunos autores han hecho referencia a la relación del polimorfismo con la actividad plasmática de la CETP <sup>253</sup>. Sin embargo esta relación no se conoce de forma clara ya que si bien Freeman et al en un primer estudio describen que el alelo B2 del polimorfismo *Taq IB* se asocia con menor actividad de la proteína y en consecuencia con mayores niveles plasmáticos de C-HDL <sup>255</sup>, en un estudio posterior estos mismos autores no encuentran esta asociación <sup>256</sup>, corroborando la ausencia de asociación del polimorfismo *Taq IB de CETP* con la actividad de la proteína descrita en otros trabajos <sup>257</sup>. En este contexto Kuivenhoven et al demuestran que la heterogenicidad del gen *CETP* se asocia con cambios en las concentraciones plasmáticas de la proteína CETP y del C-HDL <sup>258</sup>. En este estudio la ausencia de la mutación se asocia con concentraciones plasmáticas de la proteína elevadas y con niveles de C-HDL bajos, asumiendo una relación positiva entre la concentración de la proteína en plasma y la actividad de la misma y una relación inversa de estos dos parámetros con los niveles de C-HDL <sup>258</sup>. No obstante la falta

de consenso respecto a la relación del polimorfismo con la actividad plasmática de la CETP y el hecho de que este polimorfismo no es una mutación funcional y no influye en la regulación transcripcional del gen *CETP*<sup>259</sup>, ha llevado a algunos autores a sugerir la existencia de un desequilibrio de unión con una mutación desconocida en la región reguladora del gen *CETP*<sup>157</sup>, o bien que mutaciones en CETP influyan en la especificidad de la proteína por el sustrato y así en los niveles de lípidos plasmáticos<sup>202</sup>.

En varios estudios se ha hecho referencia a la existencia de factores confundentes que afectan a la relación del polimorfismo con los niveles de lípidos plasmáticos. Principalmente se ha demostrado la influencia del IMC<sup>256</sup>, el consumo de alcohol<sup>202</sup> y el tabaco<sup>260</sup>. En relación al IMC se ha descrito que el efecto del polimorfismo *Taq IB* es más evidente en individuos no obesos que en obesos<sup>261</sup>. En nuestra población, al analizar la influencia del IMC sobre el efecto del polimorfismo *Taq IB de CETP* en los niveles de lípidos, observamos que el alelo B2 se asocia en nuestros niños con niveles más altos de C-HDL y Apo AI, así como con menores niveles de C-LDL en todos los terciles de IMC. Podemos considerar por tanto que en nuestra población la influencia del polimorfismo *Taq IB de CETP* sobre el perfil lipídico es tan consistente que no se modifica en función del IMC de nuestros niños.

### **Polimorfismos en el gen *PON1* y niveles plasmáticos de lípidos**

La paraoxonasa 1 es una esterhidrolasa que se encuentra unida a las partículas HDL y evita la acumulación de lípidos oxidados en las partículas LDL, previniendo así su oxidación y la de las propias partículas HDL<sup>262 88</sup>. La actividad paraoxonasa y la susceptibilidad a ser oxidadas de las partículas HDL están

inversamente relacionadas <sup>88</sup>. En un estudio cinético realizado por Aviram et al <sup>89</sup> en 1998 se demostró que la paraoxonasa asociada a HDL protegía a estas lipoproteínas del daño oxidativo, permitiendo así que sigan desempeñando su papel como aceptor de colesterol celular. En este estudio se observó una correlación inversa entre la actividad de la paraoxonasa sérica asociada a C-HDL y la oxidación de partículas HDL. Cuando se llevaba a cabo un pretratamiento con inhibidores de paraoxonasa se observa una mayor susceptibilidad de las lipoproteínas a la oxidación, y la presencia de inhibidores que disminuían la actividad de la enzima iba acompañada de aumento de la oxidación de partículas HDL <sup>89</sup>.

Variantes del gen que codifica esta proteína se han relacionado con cambios en la actividad de la enzima y con cambios en su concentración sérica <sup>174</sup> y en algunos casos se ha especulado sobre su relación con los niveles de C-HDL. Así el polimorfismo *PON192 de PON1* se ha considerado un determinante principal de la actividad paraoxonasa <sup>263</sup>, asociándose el alelo mutado R de este polimorfismo con mayor actividad de la enzima <sup>171</sup>. Por otro lado el polimorfismo *PON55 de PON1* se ha asociado con variaciones en la concentración sérica de la enzima, observándose una mayor concentración de la enzima asociada al alelo L de este polimorfismo <sup>173</sup>.

En nuestra población la frecuencia del alelo R del polimorfismo *PON192* de la enzima paraoxonasa 1 es de aproximadamente un 30%. Es una frecuencia muy similar a la observada por otros autores en población caucásica: Macknes et al <sup>264</sup> describen una frecuencia de portadores del alelo R del 33% en población irlandesa, Ombres et al <sup>265</sup> una frecuencia de portadores del polimorfismo entorno al 30% en población italiana adulta y Oliveira et al <sup>177</sup> un 34% de portadores del

alelo R del polimorfismo *PON192* en una población de sujetos que participaron en un estudio cardiovascular como controles en Brasil. Sin embargo la frecuencia de este polimorfismo varía entre distintos grupos étnicos ya que autores como Sanghera et al <sup>266</sup> y Odawara et al <sup>267</sup> han descrito un porcentaje de portadores de este polimorfismo que alcanzaba el 50% en poblaciones orientales.

Como puede observarse el polimorfismo *PON192 de PON1* es frecuente en nuestra población de niños y su frecuencia es similar a la observada por otros autores en estudios realizados en población caucásica.

Respecto al alelo M del polimorfismo *PON55 de PON1* hemos observado que en nuestra población presenta una frecuencia del 38%. De nuevo estudios en población caucásica describen frecuencias entorno a un 35-40%, dato muy parecido al que hemos observado en nuestros niños <sup>268 177</sup>. Sin embargo en distintas poblaciones asiáticas numerosos estudios han hecho referencia frecuencias de este polimorfismo mucho menores a las observadas en población caucásica. Phuntuwate et al <sup>269</sup> observan un reducido número de portadores de esta mutación en población tailandesa, Sanghera et al <sup>270</sup> describen aproximadamente un 20% de portadores del alelo M de este polimorfismo en chinos e indios asiáticos y Sukru Aynacioglu et al <sup>271</sup> describen un 28% de presencia de la mutación en población turca.

La relación de estos polimorfismos con el perfil lipídico está poco documentada y resulta controvertida. En nuestra población no hemos observado un efecto de los polimorfismos *PON192* y *PON55 de PON1* sobre el perfil lipídico de nuestros niños. Algunos autores si han observado relación entre estos polimorfismos de *PON1* y cambios en los niveles de lípidos plasmáticos, así por ejemplo Hegele et al <sup>168 172</sup> describen en población aborigen canadiense

variaciones de los niveles de C-HDL, C-LDL y Apo B asociadas al polimorfismo *PON192*, Oliveira et al <sup>177</sup> hacen referencia a menores niveles plasmáticos de TG asociados a la variante *PON55* en población brasileña con EC y Sentí et al <sup>272</sup> describen una mayor concentración de C-LDL asociada a los genotipos QQ y QR respecto al genotipo RR del polimorfismo *PON192* en mujeres postmenopáusicas españolas. Sin embargo en todos los casos se trata de poblaciones muy específicas y los estudios realizados en población general no han encontrado ninguna asociación ni en población adulta ni en niños <sup>273 274 264</sup>.

Se ha hecho referencia en la literatura a que la ausencia de efecto de los polimorfismos *PON192* y *PON55* de *PON1* sobre el perfil lipídico y sobre la actividad paraoxonasa pueda deberse a la influencia de factores externos como la dieta <sup>275 276</sup> y el ejercicio físico <sup>277</sup>. En nuestra población no hemos observado influencia de la dieta en el efecto de los polimorfismos *PON192* y *PON55* sobre los lípidos. Respecto a la posible influencia del ejercicio físico sobre la relación de estos polimorfismos con el perfil lipídico, no hemos podido evaluar si existe esta modificación en nuestra población, ya que desconocemos el dato referente a la actividad física que realizaban nuestros niños.

### **Polimorfismos en el gen *ABCA1* y niveles plasmáticos de lípidos**

La asociación de polimorfismos en el gen del transportador ABCA1 con niveles alterados de lípidos plasmáticos y en concreto con niveles de C-HDL, se ha descrito en numerosas ocasiones <sup>81 185</sup>

La frecuencia del polimorfismo *R219K* del gen *ABCA1* observada en nuestra población es de un 50% de portadores de los genotipos RK o KK. Estos resultados son ligeramente superiores a los observados en otras poblaciones

caucásicas. Srinivasan et al <sup>278</sup> describen una frecuencia del 44% de portadores de estos genotipos en población blanca con una edad comprendida entre los 20 y 38 años y Clee et al <sup>179</sup> encontraron una frecuencia de portadores de genotipo RK o KK del 46% aproximadamente en población francocanadiense de mediana edad. De nuevo en población asiática la frecuencia de portadores de la mutación es diferente en este caso, observándose un 75% de portadores del polimorfismo *R219K* (genotipos RK o KK) aproximadamente <sup>279</sup>, frecuencia que es aún más elevada en población negra norteamericana alcanzando el 85% <sup>278</sup>. Las frecuencias en estos grupos resultan claramente superiores a la observada en nuestra población y en general en población caucásica.

La frecuencia de portadores del polimorfismo *V771M* (genotipo VM o MM) en nuestra población es más baja, situándose entorno al 8% aproximadamente, dato que concuerda con la frecuencia descrita por Clee et al en 2001 <sup>179</sup> para población francocanadiense sin manifestaciones clínicas de EC que se sitúa en una frecuencia de portadores del 6% y con los datos de Tregouet et al <sup>190</sup> que refieren la baja frecuencia de esta mutación en población occidental. De nuevo estos resultados contrastan con los descritos por Yamakawa et al <sup>280</sup> en población japonesa que presenta un porcentaje de individuos portadores de la mutación del 19% aproximadamente, claramente mayor que la observada en nuestra población y en general en población caucásica.

Numerosos autores han hecho referencia a la contribución de los polimorfismos genéticos de *ABCA1* a los niveles plasmáticos de C-HDL <sup>187 281</sup>. En este sentido al polimorfismo *R219K* de *ABCA1* se le ha atribuido carácter ateroprotector asociándolo con niveles elevados de C-HDL y Apo AI así como con niveles disminuidos de TG <sup>179 280</sup>, aunque en otras ocasiones el efecto

ateroprotector del polimorfismo solo se ha observado asociado a determinadas características como son el sexo femenino <sup>282</sup>, el hábito de fumar <sup>189</sup> o un determinado genotipo de Apo E <sup>188</sup>, sugiriendo que el efecto funcional del polimorfismo *R219K* podría ser modulado por otros factores genéticos y/o ambientales.

Al analizar el efecto del polimorfismo *R219K de ABCA1* en la población prepuberal del Estudio 4P no hemos observado relación directa de esta variante genética de *ABCA1* con los niveles plasmáticos de lípidos. En población española Cenarro et al <sup>189</sup> llevaron a cabo un estudio en pacientes con hipercolesterolemia familiar con y sin EC. En este trabajo el alelo K resultó ser más frecuente en individuos con hipercolesterolemia familiar y sin EC prematura, sugiriendo que la variante genética del polimorfismo *R219K de ABCA1* podría influir en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis en estos individuos, pero sin embargo no encontraron efecto del polimorfismo sobre el perfil lipídico. Otros autores como Tregouet et al <sup>190</sup> corroboran la ausencia de cambios en el perfil lipídico a pesar de observar asociación del polimorfismo *R219K de ABCA1* con efecto ateroprotector.

Es posible por tanto que, como se sugiere en estos trabajos <sup>189 190</sup>, no estemos observando diferencias entre los genotipos del polimorfismo *R219K de ABCA1* en los niveles plasmáticos de lípidos y en concreto de C-HDL de nuestros niños porque la presencia del alelo K se traduzca en un transporte reverso de colesterol más eficiente que favorezca el efecto ateroprotector de esta variante genética pero no en afectación de dichos niveles <sup>283 186</sup> porque su efecto sobre el C-HDL afecte a otros aspectos de estas lipoproteínas como el tamaño y sus niveles tisulares y no necesariamente a sus niveles plasmáticos <sup>284</sup>.



Se ha descrito en la literatura que existen factores confundentes como el IMC <sup>278</sup>, que pueden modificar el efecto de este polimorfismo sobre los lípidos. Así Srinivasan et al <sup>278</sup> en una población con una edad comprendida entre los 20 y los 38 años observaron que el C-HDL aumentaba paralelamente a la edad en los portadores del polimorfismo y que al aumentar el IMC, los niveles de TG de estos individuos experimentaban un incremento menor que en los portadores del alelo R (no mutado) en homocigosis. Clee et al <sup>285</sup> refieren a su vez que el fenotipo de las mutaciones en heterocigosis de *ABCA1* es más pronunciado en individuos de mayor edad. En relación a estos datos en nuestra población hemos observado que al igual que en el trabajo de Srinivasan et al <sup>278</sup> la presencia de mutación (genotipos RK o KK) se asocia con cambios en el perfil lipídico, concretamente en nuestra población se asocia con niveles de Apo AI más elevados en el tercil más alto de IMC.

Respecto al polimorfismo *V771M de ABCA1* al analizar la influencia de esta variante genética sobre el perfil lipídico en nuestra población, hemos observado que los niveles de C-HDL y Apo AI son moderadamente más altos en los portadores de la mutación (genotipo VM/MM). Esta diferencia se hace significativa en el grupo de los niños, observándose niveles de C-HDL claramente más elevados asociados a los genotipos VM/MM en este grupo. El polimorfismo *V771M* es otro de los SNPs de *ABCA1* que más se ha asociado con los niveles plasmáticos de lípidos, en concreto con niveles de C-HDL y Apo AI elevados <sup>192</sup>.

En los últimos años varios autores ha hecho referencia a la relación del polimorfismo *V771M de ABCA1* con protección frente al desarrollo de aterosclerosis, ya sea a través de su asociación con el diámetro mínimo de obstrucción arterial como a través de su asociación con un perfil lipídico más

favorable <sup>179 192</sup>. En otras poblaciones como la japonesa también se han descrito niveles de Apo AI significativamente más elevados asociados a esta variante genética de ABCA1, en niños y adolescentes de 12 a 15 años de edad <sup>280</sup>. Respecto al mecanismo por el que el polimorfismo *V771M* influye en los niveles plasmáticos de C-HDL y Apo AI, Probst et al <sup>184</sup> sugieren la posibilidad de que el cambio aminoacídico de valina por metionina que causa el polimorfismo podría influir en la regulación del transportador ABCA1 a través de la oxidación de la metionina, ya que se sabe que en el metabolismo de las lipoproteínas la oxidación de metionina en Apo AI es clave para la activación de la LCAT y por tanto el cambio de valina por metionina en el codón 771 podría afectar a la funcionalidad del transportador ABCA1 a través de la Apo AI y finalmente reflejarse en los niveles plasmáticos del C-HDL <sup>184</sup>.

Haciendo referencia a la influencia de factores ambientales en el efecto del polimorfismo *V771M de ABCA1* sobre los lípidos plasmáticos Frikke-Smith et al <sup>192</sup> describen una asociación más evidente de esta mutación con niveles de C-HDL elevados en mujeres. Teniendo en cuenta este dato y considerando los antecedentes del Estudio Cuatro Provincias respecto a la influencia de la DHEA-S sobre el efecto que el genotipo de Apo E tiene sobre los lípidos <sup>286</sup> y el hecho de que los niveles de la hormona son distintos en niños y niñas <sup>286</sup>, nos hemos planteado que otro posible factor confundente de la relación de los polimorfismos *R219K* y *V771M de ABCA1* sobre el perfil lipídico es la influencia hormonal. En este sentido otros autores como Yamakawa et al <sup>280</sup> también consideran interesante el estudio de la influencia de factores hormonales en polimorfismos de *ABCA1*.

Respecto a la influencia de los niveles de DHEA-S en la relación del polimorfismo *R219K* con el perfil lipídico hemos observado que únicamente los niños que tienen los niveles de DHEA-S más bajos presentan niveles de C-HDL y Apo AI claramente más elevados asociados al alelo K. Dado que sabemos que los niveles de la hormona en nuestra población son más bajos en niños que en niñas es posible que en nuestra población los niveles de DHEA-S modulen el efecto del polimorfismo *R219K de ABCA1* sobre los lípidos plasmáticos. Además podría explicar por que estamos observando un efecto directo del polimorfismo *V771M* sobre los niveles plasmáticos de Apo AI únicamente en niños, donde la DHEA-S es más baja. En este contexto hubiese sido interesante poder evaluar la relación de los niveles de DHEA-S en el efecto del polimorfismo *V771M de ABCA1* sobre el perfil lipídico, lamentablemente dada la baja frecuencia de portadores del polimorfismo observada en nuestra población, el tamaño de la muestra en los distintos terciles de DHEA-S disminuye considerablemente y no nos permite considerar los resultados con solidez estadística. Respecto la influencia del IMC en el efecto del polimorfismo *V771M de ABCA1* sobre los niveles de lípidos plasmáticos, al igual que en el caso del análisis de la influencia hormonal el tamaño de la muestra una vez dividimos la población por terciles de IMC, es insuficiente para poder considerar los resultados del análisis estadístico.

## ***CONCLUSIONES***

1. En nuestra población constituida por 1255 niños españoles de 6 a 8 años de edad, no hemos encontrado diferencias en las frecuencias de los polimorfismos *MspI* -75 y *MspI* +83 de *APOAI*, *Taq IB* de *CETP*, *PON192* y *PON55* de *PON1* y *R219K* y *V771M* de *ABCA1* respecto a las frecuencias descritas en otras poblaciones caucásicas.

2. La asociación del polimorfismo *MspI* -75 del gen de la apolipoproteína AI con niveles plasmáticos de apolipoproteína AI descrita en otras poblaciones se observa en nuestros niños de edad prepuberal únicamente cuando la ingesta de grasa total y saturada es baja. No hemos observado asociación del polimorfismo *MspI* +83 del gen de la apolipoproteína AI con el perfil lipídico.

3. El polimorfismo *Taq IB* de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (*CETP*) presenta una asociación altamente significativa con niveles más altos de C-HDL y Apo AI y con niveles más bajos de colesterol LDL. Esta asociación es idéntica en niños y niñas y es independiente del IMC.

4. No hemos encontrado variaciones de los niveles plasmáticos de lípidos en función de los polimorfismos *PON192* y *PON55* del gen de la paraoxonasa 1 en la población estudiada. Ninguno de los factores ambientales analizados (IMC y dieta) modifica este hallazgo.

5. El alelo K del polimorfismo *R219K* del gen del transportador ABCA1 se asocia en nuestra población con niveles más altos de C-HDL y Apo AI en el tercil más bajo de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) en niños y con niveles más altos de Apo AI en el tercil más elevado de IMC. El alelo mutado M del polimorfismo *V771M* de *ABCA1* se asocia con niveles de Apo AI más elevados únicamente en niños.

***ANEXO***

**CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS  
(CFCA)**



## ***BIBLIOGRAFÍA***

<sup>1</sup> Kannel WB, Dawber TR, Kagan A et al. Factors of risk in the development of coronary Heart disease. Six years follow-up experience: the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1971; 55: 33-9.

<sup>2</sup> Simons LA. Interrelations of lipids and lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 countries. *Am J Cardiol* 1986; 57: 56-106.

<sup>3</sup> Martín M, Hulley, Browner W et al. Serum cholesterol, blood pressure and mortality: implication from a cohort of 361.662 men. *Lancet* 1986; 2: 933-6.

<sup>4</sup> Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF et al. Incidence of coronary heart disease and lipoproteins levels: the Framingham Study. *JAMA* 1986; 256: 2835-8.

<sup>5</sup> Keys A. Coronary heart disease in Seven Countries. *Circulation* 1970; 41 (suppl D): 1-211.

<sup>6</sup> Keys A, Menotti A, Aravanis C et al. The Seven Countries Study: 2289 deaths in 15 years. *Prev Med* 1984; 13: 141-54.

<sup>7</sup> Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is the relationship between serum cholesterol and risk of premature death coronary heart disease continuous and graded?. Findings in 356.222 primary screens of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256: 2823-8.

<sup>8</sup> Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4.444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-9.

<sup>9</sup> The Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) study group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in

patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998; 339: 1349-57.

<sup>10</sup> Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-14.

<sup>11</sup> Genest JJ, McNamara JR, Salem DN et al. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1185-9.

<sup>12</sup> Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerosis coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992; 70: 733-7.

<sup>13</sup> Lipid Research Clinics Program Epidemiology Committee. Plasma lipid distribution in selected north american populations: The Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. *Circulation* 1979; 60: 427-39.

<sup>14</sup> Gordon DJ, Knole J, Probstfield JL et al (for the Lipid Research Clinics Program): High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men: The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation* 1986; 74: 1217-25.

<sup>15</sup> MRFIT Group. MRFIT: Risk factor changes and mortality results. *JAMA* 1982; 248: 1465-77.

<sup>16</sup> Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NACEP). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-97.

<sup>17</sup> Gotto AM Jr and Brinton EA. Assessing Low Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Risk Factor in Coronary Heart Disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 717-24.

- <sup>18</sup> Von Eckardeinstein A, Funke H, Henke A et al. Apolipoprotein A-I variants. Naturally occurring substitutions of proline residues affect plasma concentration of apolipoprotein A-I. *J Clin Invest* 1989; 84: 1722-30.
- <sup>19</sup> Funke H, Von Eckardeinstein A, Pritchard PH et al. A frameshift mutation in the human apolipoprotein AI gene causes high density lipoprotein deficiency, partial lecithin:cholesterol-acyltransferase deficiency, and corneal opacities. *J Clin Invest* 1991; 87:371-6.
- <sup>20</sup> Schaefer EJ, Levy RI, Anderson DW et al. Plasma-triglycerides in regulation of H.D.L.-cholesterol levels. *Lancet* 1978; 19: 391-3.
- <sup>21</sup> Geurian K, Pinson JB, Weart CW. The triglyceride connection in atherosclerosis. *Ann Pharmacother* 1992; 26: 1109-17.
- <sup>22</sup> Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P et al. Relation of high TG-low HDL cholesterol and LDL cholesterol to the incidence of ischemic heart disease. An 8-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1114-20.
- <sup>23</sup> Eberly LE, Stamler J, Neaton JD; Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Relation of triglyceride levels, fasting and nonfasting, to fatal and nonfatal coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1077-83.
- <sup>24</sup> Jara J, Bellod P, Delgado M et al. Valor retrospectivo de los triglicéridos y las lipoproteínas plasmáticas en el infarto de miocardio. *Rev Clin Esp* 1987; 180: 20-4.
- <sup>25</sup> Kannel WB, Castelli WP, Gordon T et al. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1971; 74: 1-12.

- <sup>26</sup> Lauer RM, Lee J and Clarke WR. Factors Affecting the Relationship Between Childhood and Adult Cholesterol Levels: The Muscatine Study. *Pediatrics* 1987; 82: 309-18.
- <sup>27</sup> Webber LS, Srinivasan SR, Wattigney WA et al. Tracking of serum lipids and lipoproteins from childhood to adulthood. The Bogalusa Heart Study. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 884-99.
- <sup>28</sup> Sánchez-Bayle M, González-Requejo A, Ruiz C, et al. Serum lipids and apolipoproteins in Spanish Children and adolescents: a 5 year follow-up. *Acta Paediatr* 1996; 85: 292-4.
- <sup>29</sup> Dwyer T, Hisao I, Kimberlie D et al. Differences in HDL Cholesterol Concentrations in Japanese, American, and Australian Children. *Circulation* 1997; 96: 2830-6.
- <sup>30</sup> López D, Gil A, Porres A et al. Perfil lipoproteico en niños y adolescentes de la Comunidad de Madrid. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 366-70.
- <sup>31</sup> Garcés C, Gil A, Benavente M et al. Consistently High Plasma High-Density Lipoprotein-Cholesterol Levels in Children in Spain, a Country With Low Cardiovascular Mortality. *Metabolism* 2004; 53: 1045-7.
- <sup>32</sup> Glomset, J.A. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968; 9: 155-67.
- <sup>33</sup> Ross, R., and Glomset, J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180: 1332-9.

- <sup>34</sup> Lewis GF. Determinants of plasma HDL concentrations and reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21: 345-52.
- <sup>35</sup> Nofer JR, Kehrel B, Fobker M et al. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002; 161: 1-16.
- <sup>36</sup> Barter PJ, Nicholls S, Rye K-A et al. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95: 764-72.
- <sup>37</sup> Cenarro A, Artieda M, Pocoví M. Genes candidatos en las alteraciones del metabolismo de las HDL. *Cardiovascular Risk Factors* 2004; 13: 94-105.
- <sup>38</sup> Gómez-Coronado D, Suárez D y Lasunción MA. Metabolismo de las lipoproteínas y su regulación. En: *Medicina cardiovascular. Arteriosclerosis*. Tomo I. Barcelona: Masson 2005; 601-24.
- <sup>39</sup> Levy RI and Rifkind BM. The structure, function and metabolism of high-density lipoproteins: A status report. *Circulation* 1980; 62(4 Pt 2): IV4-8.
- <sup>40</sup> Edelstein C, Gordon J, Vergani C et al. Comparative in vitro study of the pro-apolipoprotein AI to apolipoprotein AI converting activity between normal and Tangier plasma. *J Clin Invest* 1984; 74: 1094-103.
- <sup>41</sup> Jonas A, Kezdy KE and Wald JH. Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs. *J Biol Chem* 1989; 264: 4818-24.
- <sup>42</sup> Zannis VI, Karathanasis SK, Keutmann HT et al. Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein AI. Secreted apolipoprotein AI isoprotein 2 is a propeptide. *Proc Natl Acad Sci Biochem* 1983; 80: 2574-8.
- <sup>43</sup> Lewis GF and Rader DJ. HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res* 2005; 96: 1221-32.

- <sup>44</sup> Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE et al. A protein co-factor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 46: 1493-8.
- <sup>45</sup> Soutar AK, Garner CW, Baker HN et al. The effects of plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyl-transferase. *Biochemistry* 1975; 14: 3057-64.
- <sup>46</sup> Krimbou L, Marcil M and Genest J. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 258-67.
- <sup>47</sup> Trigatti B, Rigotti A and Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 123-31.
- <sup>48</sup> Eggerman TL, Hoeg JM, Meng MS et al. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. *J Lipid Res* 1991; 32: 821-8.
- <sup>49</sup> Brewer HB, Ronan R, Meng M et al. Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. *Methods Enzymol* 1986; 128: 223-46.
- <sup>50</sup> Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC et al. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 164: 1-13.
- <sup>51</sup> Jahn CE, Osborne JC, Schaefer EJ et al. Activation of the activity of hepatic lipase by apolipoprotein A-II. Characterization of a major component of high density lipoprotein particles as the activating plasma component in vitro. *Eur J Biochem* 1983; 131: 25-9.
- <sup>52</sup> Zhong S, Goldberg IJ, Bruce C et al. Human ApoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 2457-67.

- <sup>53</sup> Shore V, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low-density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 1973; 12: 502-7.
- <sup>54</sup> Beisiegel U, Weber W, Ihrke G et al. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 1989; 341: 162-4.
- <sup>55</sup> Ji ZS, Fazio S, Lee YL et al. Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1994; 269: 2764-72.
- <sup>56</sup> Ishikawa Y, Fielding CJ, Fielding PE et al. A change in apolipoprotein B expression is required for the binding of apolipoprotein E to very low-density lipoprotein. *J Biol Chem* 1988; 263: 2744-9.
- <sup>57</sup> Mahley R and Ji Z. Remnant lipoprotein metabolism: Key pathways involving cell surface heparin sulphate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40: 1-16.
- <sup>58</sup> Mahley R and Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 207-17.
- <sup>59</sup> Von Eckardstein A, Nofer JR and Assman G. High-density lipoprotein and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 13-27.
- <sup>60</sup> Yokohama S. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1392: 1-15.
- <sup>61</sup> Fielding CJ and Fielding PE. Cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1533: 175-89.



- <sup>62</sup> Oram JF and Lawn RM. ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 2001; 42: 1173-9.
- <sup>63</sup> Dean M, Hamon Y, Chimini G et al. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lip Res* 2001; 42: 1007-17.
- <sup>64</sup> Oram JF. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 373-81.
- <sup>65</sup> Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-45.
- <sup>66</sup> Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA et al. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiological Research* 2004; 53: 235-43.
- <sup>67</sup> Basso F, Freeman L, Knapper CL et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res* 2003; 44: 296-302.
- <sup>68</sup> Fielding CJ and Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36: 211-28.
- <sup>69</sup> Clay MA, Pyle DH, Rye KA et al. Formation of spherical, reconstituted high density lipoproteins containing both apolipoproteins A-I and A-II mediated by lecithin: cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 2000; 275: 9019-25.
- <sup>70</sup> Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M et al. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001; 155: 269-81.
- <sup>71</sup> Ohashi R, Mu H, Wang X et al. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Q J Med* 2005; 98: 845-56.

- <sup>72</sup> Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ et al. Cholesterol ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 160-7.
- <sup>73</sup> Bruce C, Beamer LJ and Tall AR. The implications of the structure of the bactericidal/permeability-increasing protein on the lipid-transfer function of the cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 426-34.
- <sup>74</sup> Bruce C, Chouinard RA, Tall AR et al. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 1998; 18: 297-330.
- <sup>75</sup> Inazu A, Brown ML, Hesler CB et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990; 323: 1234-8.
- <sup>76</sup> Ikewaki K, Nishiwaki M, Sakamoto T et al. Increased catabolic rate of low density lipoproteins in humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 1995; 96: 1573-81.
- <sup>77</sup> Brinton EA, Eisenberg S and Breslow JL. Human HDL cholesterol levels are determined by Apo AI fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates of HDL particle size. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 707-20
- <sup>78</sup> Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 245-56.
- <sup>79</sup> Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ et al. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002; 43: 1997-2006.

- <sup>80</sup> Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L et al. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1750-4.
- <sup>81</sup> Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee SM et al. Mutations in the ABCA1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* 1999; 354: 1341-6.
- <sup>82</sup> O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem* 2005; 51: 351-9.
- <sup>83</sup> Wong K and Ryan RO. Characterization of apolipoprotein A-V structure and mode of plasma triacylglycerol regulation. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18: 319-24.
- <sup>84</sup> Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA et al. Structure and Interfacial Properties of Human Apolipoprotein A-V. *J Biol Chem* 2003; 278: 34438-44.
- <sup>85</sup> Talmud P, Martin S, Taskinen M et al. APO A5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: result from the LOCAT study. *J Lipid Res* 2004; 45: 750-6.
- <sup>86</sup> Navab M, Hama SY, Hough GP et al. High density lipoprotein enzymes: their role in vascular biology. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 449-56.
- <sup>87</sup> Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000; 41:1495–508.
- <sup>88</sup> Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL et al. Paraoxonase inhibits high density-lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidation role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-90.

- <sup>89</sup> Aviram M, Billecke S, Sorenson R et al. Paraoxonase Active Site Required for Protection Against LDL Oxidation Involves Its Free Sulfhydryl Group and Is Different From That Required for Its Arylesterase/Paraoxonase Activities. Selective Action of Human Paraoxonase Allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1617-24.
- <sup>90</sup> Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin Chem* 2004; 50: 2309-15.
- <sup>91</sup> Getz GS and Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 261-7.
- <sup>92</sup> Ordovás JM. Aspectos metabólicos y genéticos de las alteraciones de las lipoproteínas de alta densidad. Hipoalfa e hiperalfalipoproteinemias. En: Carmena R, Ordovás JM, editores. *Hiperlipemias. Clínica y Tratamiento*. Barcelona: Doyma, SA, 1999; 155-71.
- <sup>93</sup> Serfaty-Lacrosiniere C, Civeira F, Lanzberg A et al. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1994; 107: 85-98.
- <sup>94</sup> Genest J Jr, Matrin-Munley SS, McNamara JR et al. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992; 85: 2025-33.
- <sup>95</sup> Utermann G, Steinmetz A, Paetzold R et al. Apolipoprotein AI (Marburg): studies of two kindreds with a mutant of human apolipoprotein AI. *Hum Genet* 1982; 61: 329-37.
- <sup>96</sup> Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW et al. Identification of homozygosity for a human apolipoprotein A-I variant. *J Lipid Res* 1986; 27: 436-41.

- <sup>97</sup> Ladias JAA, Kuiterovich POJ, Smith HH et al. Apolipoprotein A-I Baltimore (Arg10-Leu), a new Apo AI variant. *Hum Genet* 1990; 84: 439-45.
- <sup>98</sup> Matsunaga T, Hiasa Y, Yanagi H et al. Apolipoprotein AI deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2793-7.
- <sup>99</sup> Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A et al. A-I (Milano) apoprotein: decreased high density lipoprotein cholesterol levels, with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest* 1980; 66: 892-900.
- <sup>100</sup> Gluek CJ, Fallat RW, Millet F et al. Familial hyperalphalipoproteinemia: studies in eighteen kindreds. *Metabolism* 1975; 25: 1243-65.
- <sup>101</sup> Yamashita S, Maruyama T, Hirano KI et al. Molecular mechanisms, lipoprotein anomalies and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2000; 152: 271-85.
- <sup>102</sup> Hamsten A, Iselius L, Dahlen G et al. Genetic and cultural inheritance of serum lipids, low and high density lipoprotein cholesterol and serum apolipoproteins A-I, A-II and B. *Atherosclerosis* 1986; 60: 199-208.
- <sup>103</sup> Cohen JC, Wang Z, Grundy SM et al. Variation at the hepatic lipase and apolipoprotein AI/CIII/AIV loci is a major cause of genetically determined variation in plasma HDL-cholesterol level. *J Clin Invest* 1994; 94: 2377-84.
- <sup>104</sup> Jeffs JA, Godsland IF, Johnston DG. Less than 50% of variation in HDL cholesterol between and within individuals, is explained by established predictors. *Atherosclerosis* 2006; 184: 178-87.

- <sup>105</sup> Criqui MH, Cowan LD, Tyroler HA et al. Lipoproteins as mediators for the effects of alcohol consumption and cigarette smoking on cardiovascular mortality: results from the Lipid Research Clinics Follow-up Study. *Am J Epidemiol* 1987; 126: 629-37.
- <sup>106</sup> Durstine JL, Haskell WL. Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins. *Exerc Sport Sci Rev* 1994; 22: 477-521.
- <sup>107</sup> Berns MA, Devries JH and Katan MB. Increase in body fatness as major determinant of changes in serum total cholesterol and HDL cholesterol in young men over a 10-year period. *Am J Epidemiol* 1984; 130: 1109-22.
- <sup>108</sup> Grundy SM and Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 1990; 31: 1149-72.
- <sup>109</sup> Sentí M, Masiá R, Pena A et al. Determinantes antropométricos y dietéticos de la concentración sérica del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad en un estudio de base poblacional. El estudio REGICOR. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51: 979-87.
- <sup>110</sup> Perusse L, Despres JP, Tremblay A et al. Genetic and environmental determinants of serum lipids and lipoproteins in French Canadian families. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 308-18.
- <sup>111</sup> Dastani Z, Engert JC, Genest J et al. Genetics of high-density lipoproteins. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21: 329-35.
- <sup>112</sup> Sviridov D and Nestel PJ. Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18: 157-63.
- <sup>113</sup> Lusis A. Genetic factors affecting blood lipoproteins, the candidate gene approach. *J Lipid Res* 1988; 29: 397-429.

- <sup>114</sup> Smith LC, Pownall HJ, Gotto AM Jr. The plasma lipoproteins: structure and metabolism. *Annu Rev Biochem* 1978; 47: 751-7.
- <sup>115</sup> Rohein PS. Atherosclerosis and lipoprotein metabolism: Role of reverse cholesterol transport. *Am J Cardiol* 1986; 57: 3c-10c.
- <sup>116</sup> Wang X and Paigen B. Genetics of Variation in HDL Cholesterol in Humans and Mice. *Circ Res* 2005; 96: 27-42.
- <sup>117</sup> Cohen JC, Kiss RC, Pertsemlidis A et al. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004; 305: 869-72.
- <sup>118</sup> Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM et al. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 105-15.
- <sup>119</sup> Ajees A, Anantharamaiah G, Mishra V et al. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: Insights into its prospective effect against cardiovascular disease. *PNAS* 2006; 103: 2126-31.
- <sup>120</sup> Karathanasis SK. Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein A-I, C-III and A-IV genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6374-8.
- <sup>121</sup> Schaefer EJ, Heaton WH, Wetzel MG et al. Plasma apolipoprotein A-1 absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1982; 2: 16-26.
- <sup>122</sup> Rader D. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006; 116: 3090-100.
- <sup>123</sup> Groenendijk M, Cantor R, de Bruin T et al. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 2001; 157: 1-11.

- <sup>124</sup> Juo SH, Wyszynski DF, Beaty TH et al. Mild association between the G/A polymorphism in the promoter of the apolipoprotein A-I gene and apolipoprotein A-I levels: a meta-analysis. *Am J Med Genet* 1999; 82: 235-41.
- <sup>125</sup> Wang XL, Badenhop R, Humphrey KE et al. New polymorphism at +83bp of human apolipoprotein AI gene: association with increased circulating high density lipoprotein cholesterol levels. *Genet Epidemiol* 1996; 13: 1-10.
- <sup>126</sup> Carmena-Ramon RF, Ordovás JM, Ascaso JF et al. Influence of genetic variation at the apo AI gene locus on lipid levels and response to diet in familial hipercolesterolemia. *Atherosclerosis* 1998; 139: 107-13.
- <sup>127</sup> López-Miranda J, Ordovás JM, Espino A et al. Influence of mutation in human apolipoprotein A-1 gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat. *Lancet* 1994; 343: 246-9.
- <sup>128</sup> Mata P, López-Miranda J, Pocoví M et al. Human apolipoprotein A-I gene mutation influences plasma low density lipoprotein cholesterol response to dietary fat saturation. *Atherosclerosis* 1998; 137: 367-76.
- <sup>129</sup> Lackner KJ, Law SW, Brewer HB et al. The human apolipoprotein A-II gene is located on chromosome 1- *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 877-83.
- <sup>130</sup> Deeb SS, Takata K, Peng RL et al. A splice-junction mutation responsible for familial apolipoprotein A-II deficiency. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 822-7.
- <sup>131</sup> Van't Hooft FM, Ruotolo G, Boquist S et al. Human evidence that the apolipoprotein A-II gene is implicated in visceral fat accumulation and metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Circulation* 2001; 104: 1223-8.



- <sup>132</sup> Benson MD, Liepnieks J, Yakazi M et al. A new human hereditary amyloidosis: the result of a stop-codon mutation in the apolipoprotein AII gene. *Genomics* 2001; 72: 272-7.
- <sup>133</sup> Deeb S, Failor A, Brown BG et al. Molecular genetics of apolipoproteins and coronary heart disease. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 1986; 51: 403.
- <sup>134</sup> Thorn JA, Stocks J, Reichl D et al. Variability of plasma apolipoprotein (apo) A-II levels associated with an apo A-II gene polymorphism in monozygotic twins pairs. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1180: 299-303.
- <sup>135</sup> Schulte H, Funke H, Frossard P et al. The *MspI* RFLP 3' to the human apolipoprotein A-II gene is neutral with respect to atherosclerosis in Germans. *Am J Hum Genet* 1986; 39: 293.
- <sup>136</sup> Myklebost OS, Rogne I, Hjermann B et al. Association analysis of lipid levels and apolipoprotein restriction fragment length polymorphisms. *Hum Genet* 1990; 86: 209-14.
- <sup>137</sup> Civeira F, Genest J, Pocoví M et al. The *MspI* restriction fragment length polymorphism 3' to the apolipoprotein A-II gene: relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1992; 92: 165-76.
- <sup>138</sup> Dupuy-Gorce AM, Desmarais S, Vigneron C et al. DNA polymorphisms in linkage disequilibrium at the 3' end of the human APO AII gene: relationships with lipids, apolipoproteins and coronary heart disease. *Clin Genet* 1996; 50: 191-8.
- <sup>139</sup> Das H, McPherson J, Bruns G et al. Isolation, characterization and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985; 260: 6240-7.

- <sup>140</sup> Zannis VI, Breslow JL, Utermann G et al. Proposed nomenclature of apo E genotypes and phenotypes. *J Lipid Res* 1982; 23: 911-4.
- <sup>141</sup> Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW et al. Human apolipoprotein E: the complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982; 257: 4171-8.
- <sup>142</sup> Kuusi T, Nieminen M, Ehnholm C et al. Apolipoprotein E polymorphism and coronary heart disease: increased prevalence of apolipoprotein E4 in angiographically verified coronary patients. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 237-41.
- <sup>143</sup> Lussier-Cacan S, Bolduc A, Xhignese M et al. Impact of age and body size on inter-individual variation in measures of lipid metabolism: influence of gender and apolipoprotein E genotype. *Clin Genet* 2000; 57: 35-47.
- <sup>144</sup> Eichner JE, Dunn ST, Perveen G et al. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 487-95.
- <sup>145</sup> Sanghera D, Ferrell R, Aston C et al. Quantitative effects of the apolipoprotein E polymorphism in a biracial sample of 9-10-year-old girls. *Atherosclerosis* 1996; 126: 35-42.
- <sup>146</sup> Kataoka S, Robins DC, Cowan LD et al. Apolipoprotein E polymorphism in American Indians and its relation to plasma lipoproteins and diabetes. The Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 63: 301-10.
- <sup>147</sup> Djoussé L, Myers R, Province M et al. Influence of Apolipoprotein E, Smoking, and Alcohol Intake on Carotid Atherosclerosis. *Stroke* 2002; 33: 1357-61.
- <sup>148</sup> Srinivasan S, Ehnholm C, Wattigney W et al. Apolipoprotein E polymorphism and its associations with serum lipoprotein concentration in black versus white children: The Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 1993; 42: 381-6.

- <sup>149</sup> Srinivasan S, Ehmhlom C, Wattigney W et al. The relation of apolipoprotein E polymorphism to multiple cardiovascular risk in children: The Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 1996; 123: 33-42.
- <sup>150</sup> Srinivasan S, Ehnholm C, Elkasabany A et al. Influence of apolipoprotein E polymorphism on serum lipids as lipoprotein changes from childhood to adulthood The Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis* 1999; 143: 435-43.
- <sup>151</sup> Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA et al. An apolipoprotein influencing tryglicerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001; 294: 169-73.
- <sup>152</sup> Jakel H, Nowak M, Helleboid-Chapman A et al. Is apolipoprotein A5 a novel regulador of trygliceride-rich lipoproteins?. *Am Med* 2006; 38: 2-10.
- <sup>153</sup> Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 106-13.
- <sup>154</sup> Lusis AJ, Zollman S, Sparkes RS et al. Assigment of the human gene for cholesteryl ester transfer protein to chromosome 16q12-16q21. *Genomics* 1987; 3: 232-5.
- <sup>155</sup> Yamashita S, Hirano K, Sakai N et al. Molecular biology and patophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1529: 257-75.
- <sup>156</sup> Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH et al. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary

atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med* 1998; 338: 86-93.

<sup>157</sup> Ordovás JM, Cupples LA, Corella D et al. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1323-9.

<sup>158</sup> Kauma H, Savolainen MJ, Heikkilä R et al. Sex differences in the regulation of plasma high density lipoprotein cholesterol by genetic and environmental factors. *Hum Genet* 1996; 97: 156-62.

<sup>159</sup> Nettleton JA, Steffen LM, Ballantyne CM et al. Associations between HDL-cholesterol and polymorphism in hepatic lipase and lipoprotein lipase genes are modified by dietary fat intake in African American and White adults. *Atherosclerosis* 2006.

<sup>160</sup> Brousseau ME, O'Connor J, Ordovás JM et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1148-54.

<sup>161</sup> Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V et al. A polymorphism of cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Eur Heart J* 2003; 24: 1833-42.

<sup>162</sup> Whiting BM, Anderson JL, Muhlestein JB et al. Candidate gene susceptibility variants predict intermediate end points but not angiographic coronary artery disease. *Am Heart J* 2005; 150: 243-50.

- <sup>163</sup> Mackness MI, Durrington PN, Mackness B et al. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:383-8.
- <sup>164</sup> Harel M, Aharoni A, Gaidukov L et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 412-9.
- <sup>165</sup> Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber L et al. The human serum Paraoxonase/arylesterase gene (PON 1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498-507.
- <sup>166</sup> Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 542-7.
- <sup>167</sup> Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M et al. Human serum paraoxonase/acylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2214-25.
- <sup>168</sup> Hegele RA, Brunt JH and Connelly PW. A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 89-95.
- <sup>169</sup> Imai Y, Morita H, Kurihara H et al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphism and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2000; 149: 435-42.

- <sup>170</sup> Rodríguez Esparragón F, Hernández Trujillo Y, Macías Reyes A et al. Sobre los genes paraoxonasa-1 y SR-B1, y su importancia en la aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59: 154-64.
- <sup>171</sup> Hegele RA, Conelly PW, Hanley AJ et al. Common Genomic Variants Associated With Variation in Plasma Lipoproteins in Young Aboriginal Canadians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1060-6.
- <sup>172</sup> Mackness B, Mackness MI, Arrol S et al. Effect of molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON) on the rate of hydrolysis of paroxon. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 265-8.
- <sup>173</sup> Leview I, Negro F and James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met 54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 2935-9.
- <sup>174</sup> Blatter-Garin MC, James RW, Dussoix P et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increase risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99: 62-6.
- <sup>175</sup> Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz P et al. Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 755-61.
- <sup>176</sup> Gardemann A, Philipp M, Hess K et al. The paraoxonase Leu-Met54 and Gln-Arg191 gene polymorphisms are not associated with the risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000; 15: 421-31.
- <sup>177</sup> Oliveira SA, Mansur AP, Ribeiro CC et al. PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2004; 94: 73-7.

- <sup>178</sup> Becq F, Hamon Y, Bajetto A et al. ABCA1 an ATP binding cassette transporter required of phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. *Biol Chem* 1997; 272: 2695-9.
- <sup>179</sup> Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC et al. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and modified risk for coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 1198-1205.
- <sup>180</sup> Denis M, Haidar B, Marcil M et al. Characterization of Oligomeric Human ATP Binding Cassette Transporter A1. *J Biol Chem* 2004; 279: 41529-36.
- <sup>181</sup> Fitzgerald ML, Morris AL, Andersson LP et al. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2002; 277: 33178-87.
- <sup>182</sup> Vedhachalam C, Duong PT, Níkel M et al. Mechanism of ATP-binding cassette transporter AI (ABCA1)-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of High-density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2007; 282: 25123-30.
- <sup>183</sup> Denis M, Haidar B, Marcil M et al. Molecular and Cellular Physiology of Apolipoprotein A-I Lipidation by the ATP-binding Cassette Trasporter A1 (ABCA1). *J Biol Chem* 2004; 229: 7384-94.
- <sup>184</sup> Probst M, Thumann H, Aslanidis CH et al. Screening for functional sequence variations and mutations in ABCA1. *Atherosclerosis* 2004; 175: 269-79.
- <sup>185</sup> Brunham LR, Singaraja RR, Hayden MR. Variations on a Gene: Rare and Common Variants in ABCA1 and Their Impact on HDL Cholesterol Levels and Atherosclerosis. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 105-29.
- <sup>186</sup> Singaraja R, Brunham L, Visscher H et al. Efflux and Atherosclerosis. The Clinical and Biochemical Impact of Variations in the ABCA1 Gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1322-32.

- <sup>187</sup> Wang J, Burnett JR, Near S et al. Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1983-9.
- <sup>188</sup> Evans D and Beil FU. The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary artery disease and hyperlipidemia. *J Mol Med* 2003; 81:264-70.
- <sup>189</sup> Cenarro A, Artieda M, Castillo S et al. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *J Med Genet* 2003; 40: 163-8.
- <sup>190</sup> Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V et al. In-Depth Haplotype Analysis of ABCA1 Gene Polymorphisms in Relation to Plasma Apo A1 Levels and Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 775-81.
- <sup>191</sup> Andrikovics H, Pongrácz E, Kalina A et al. Decreased Frequencies of ABCA1 Polymorphisms R219K and V771M in Hungarian Patients with Cerebrovascular and Cardiovascular Diseases. *Cerebrovasc Dis* 2006; 21: 254-9.
- <sup>192</sup> Frikke-Schmidt R, Borge G, Gorm B et al. Genetic Variation in ABCA transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest* 2004; 114: 1343-53.
- <sup>193</sup> Pajukanta P. Do DNA sequence variants in ABCA1 contribute to HDL cholesterol levels in the general population?. *J Clin Invest* 2004; 114: 1244-7.
- <sup>194</sup> De Oya M y Garcés C, en nombre de los investigadores del estudio Cuatro Provincias. Factores de riesgo cardiovascular en la edad infantil. Resultados globales del estudio Cuatro Provincias. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60: 527-24.
- <sup>195</sup> Allain C, Poons L, Chang C et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470-5.



- <sup>196</sup> Assmann G, Shrlower H and Schmitz G. Quantification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with fosfotungstic acid/MgCl<sub>2</sub>. Clin Chem 1983; 29: 2026-30.
- <sup>197</sup> Burstein M , Scholnick H and Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human plasma serum by precipitation with polyanions. J Lipid Res 1970; 11: 583-95.
- <sup>198</sup> Buccolo G and David H. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clin Chem 1973; 19: 476-82.
- <sup>199</sup> Friedewald W, Levy R and Fredickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18: 499-502.
- <sup>200</sup> Marcovina S, Alberts J, Henderson O et al. International Federation of Clinical Chemistry Standarization Project for measurement of apolipoproteins AI and BIII. Comparability of apolipoproteins AI values by use of international reference material. Clin Chem 1993; 39: 773-81.
- <sup>201</sup> Paul-Hayase H, Rosseneu M, Robinson D et al. Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene cluster: deletion of genetic variation determinig plasma apo AI, apo CIII and apo AIV concentrations. Hum Genet 1992; 88: 439-46.
- <sup>202</sup> Fumeron F, Betoulle D, Luc Gérald et al. Alcohol Intake Modulates the Effect of a Polymorphism of the Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene on Plasma High Density Lipoprotein and the Risk of Myocardial Infarction. J Clin Invest 1995; 96: 1664-71.
- <sup>203</sup> Humbert R, Alder DA, Disteché CM et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. Nat Genet 1993; 3: 73-6.

- <sup>204</sup> Kao Y, Donaghue K, Chan A et al. A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J Clin Endocrinol Met* 1998; 83: 2589- 92.
- <sup>205</sup> Moreiras-Varela O, Carvajal A y Cabrera L. Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide. Madrid, 1999.
- <sup>206</sup> Mataix J, Mañas M, Llopis J et al. Tabla de composición de alimentos españoles. Editorial Universidad de Granada, Campus Universitario de Cartuja, 1998.
- <sup>207</sup> Gómez-Gerique JA, Gutiérrez-Fuentes JA, Montaya MT et al. Lipid profile of the Spanish population: the DRECE (diet and risk of cardiovascular disease in Spain) study. DRECE study group. *Med Clin (Barc)* 1999; 113: 730-5.
- <sup>208</sup> De Oya M. Colesterol HDL y mortalidad cardiovascular en España. Comentario editorial. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51: 988-90.
- <sup>209</sup> Garcés C, Lasunción MA, Ortega H et al. Factores metabólicos en la población escolar asociados a mortalidad cardiovascular en los adultos. Estudio Cuatro Provincias. *Med Clin (Barc)* 2002; 118: 767-70.
- <sup>210</sup> Ellison RC, Zhang Y, Qureshi M et al. Lifestyle determinants of high-density lipoprotein cholesterol: The National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am Heart J* 2004; 147: 529-35.
- <sup>211</sup> Royo-Bordonada MA, Gorgojo L, Ortega H et al. Greater dietary variety is associated with better biochemical nutritional status in Spanish children: The Four Provinces Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003; 13: 357-64.
- <sup>212</sup> Royo-Bordonada MA, Gorgojo L, de Oya M et al. Variedad y diversidad de la dieta de los niños españoles: Estudio Cuatro Provincias. *Med Clin (Barc)* 2003; 120: 167-71.

- <sup>213</sup> Royo-Bordonada MA, Gorgojo L, Martín-Moreno JM et al. Spanish children's diet: compliance with nutrient and food intake guidelines. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 930-9.
- <sup>214</sup> Royo-Bordonada MA, Garcés C, Gorgojo L et al. Saturated fat in the diet of Spanish children: relationship with antropometric, alimentary, nutritional and lipid profiles. *Public Health Nutr* 2006; 9: 429-35.
- <sup>215</sup> Ortega H, Castilla P, Gómez-Coronado D et al. Influence of apolipoprotein E genotype in fat-soluble plasma antioxidants in Spanish children. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 624-32.
- <sup>216</sup> Garcés C, Cano B, Lasunción MA et al. Dehydroepiandrosterone Sulfate and High-density Lipoprotein-Cholesterol Levels in Overweight Children. *Obesity* 2007; 15: 1147-54.
- <sup>217</sup> Garcés C, Gutiérrez-Guisado J, Benavente M et al. Obesity in Spanish Schoolchildren: Relationship with Lipid Profile and Insulin Resistance. *Obes Res* 2005; 13: 959-63.
- <sup>218</sup> Reichl D and Millar NE. Pathophysiology of reverse cholesterol transport: Insights from inherited disorders of lipoprotein metabolism. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 785-97.
- <sup>219</sup> Schaefer EJ, Ordovás JM, Law S et al. Familial apolipoprotein A-I and C-III deficiency, variant II. *J Lipid Res* 1985; 26: 1089-1101.
- <sup>220</sup> Jeenah M, Kessling A, Millar N et al. G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum

apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations. *Mol Biol Med* 1990; 7: 233-41.

<sup>221</sup> Kamboh MI, Aston CE, Nestlerode CM et al. Haplotype analysis of two APOA1/Msp I polymorphisms in relation to plasma levels of apo A-I and HDL-cholesterol. *Atherosclerosis* 1996; 127: 255-62.

<sup>222</sup> Larson IA, Ordovás JM, Barnard JR et al. Effects of apolipoprotein A-I genetic variations on plasma apolipoprotein, serum lipoprotein and glucose levels. *Clin Genet* 2002; 61: 176-84.

<sup>223</sup> De Franca E, Alves JGB and Hutz MH. APOA1/C3/A4 gene cluster variability and lipid levels in Brazilian children. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 535-41.

<sup>224</sup> Akita H, Chiba H, Tsuji M et al. Evaluation of G-to-A substitution in the apolipoprotein A-I gene promoter as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol levels in subjects with and without cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Hum Genet* 1995; 96: 521-6.

<sup>225</sup> Ma YQ, Thomas GN and Tomlinson B. Association of two apolipoprotein A-I gene Msp I polymorphisms with lipid and blood pressure levels. *Intern J Cardiol* 2005; 102: 309-14.

<sup>226</sup> Wang XL, Liu SX, McCredie RM et al. Polymorphisms at the 5'-End of the Apolipoprotein AI Gene and Severity of Coronary Artery Disease. *J Clin Invest* 1996; 98: 372-7.

<sup>227</sup> Xu CF, Angelico F, Del Ben M et al. Role of genetic variation at the APOAI-CIII-AIV gene cluster in determining plasma apo AI levels in boys and girls. *Genetic Epidemiol* 1993; 10: 113-22.

<sup>228</sup> Jia L, Bai H, Fu M et al. Relationship between plasma HDL subclasses distribution and apo A-I gene polymorphisms. *Clin Chim Acta* 2005; 360: 37-45.

- <sup>229</sup> Shioji K, Mannami T, Kokubo Y et al. An association analysis between ApoA1 polymorphisms and the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level and myocardial infarction (MI) in Japanese. *J Hum Genet* 2004; 49: 433-9.
- <sup>230</sup> Kamboh MI, Bunker CH, Aston CE et al. Genetic association of five apolipoprotein polymorphisms with serum lipoprotein-lipid levels in African blacks. *Genet Epidemiol* 1999; 16: 205-22.
- <sup>231</sup> Pagani F, Sidoli A, Giudici GA et al. Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1990; 31: 1371-7.
- <sup>232</sup> Minnich A, DeLangavant G, Lavigne J et al. G—A substitution at position -75 of the apolipoprotein A-I gene promoter evidence against a direct effect on HDL cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1740-5.
- <sup>233</sup> Civeira F, Pocoví M, Cenarro A et al. Adenine for guanine substitution -78 base pairs to the apolipoprotein (APO) A-I gene: relation with high-density lipoprotein cholesterol and apoA-I concentrations. *Clin Genet* 1993; 44: 307-12.
- <sup>234</sup> Ordovás JM and Mooser V. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 101-8.
- <sup>235</sup> Corella D and Ordovás JM. Single Nucleotide Polymorphisms that Influence Lipid Metabolism: Interaction with Dietary Factors. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 341-90.
- <sup>236</sup> Jacobs DR, Anderson JT, Hannan P et al. Variability in individual serum cholesterol response to change in diet. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 349-56.
- <sup>237</sup> Katan MB, Beynen AC, de Vries JH et al. Existence of consistent hypo- and hyper- responders to dietary cholesterol in man. *Am J Epidemiol* 1986; 123: 221-34.

- <sup>238</sup> Ping Ye S and Kwiterovich PO. Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1275S-84S.
- <sup>239</sup> Destrés JP, Poehlman ET, Tremblay A et al. Genotype-influenced changes in serum HDL cholesterol after short-term overfeeding in man: association with plasma insulin and triglyceride levels. *Metabolism* 1987;36; 363-8.
- <sup>240</sup> Ordovás JM, Corella D, Cupples LA et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study. *Am J Clin Nutr* 2002; 7: 38-46.
- <sup>241</sup> Tuteja R, Tuteja N, Melo C et al. Transcription efficiency of human apolipoprotein A-I promoter varies with naturally occurring A to G transition. *FEBS Lett* 1992; 304: 98-101.
- <sup>242</sup> Smith JD, Brinton EA, Breslow JL. Polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate in vivo and promoter activity in vitro. *J Clin Invest* 1992; 89: 1796-800.
- <sup>243</sup> Angotti E, Mele E, Constanzo F et al. A polymorphisms (G—A) in the -78 of the apolipoprotein A-I promoter increases transcription efficiency. *J Biol Chem* 1994; 269: 17371-4.
- <sup>244</sup> Viturro E, de Oya M, Lasunción M.A. et al. Cholesterol and saturated fat intake determine the effect of polymorphisms at *ABCG5/ABCG8* genes on lipid levels in children. *Genet Med* 2006; 8: 594-9.

- <sup>245</sup> Inaz A, Koizumi J and Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 389-96.
- <sup>246</sup> Hannuksela ML, Liinamaa MJ, Kesaniemi YA et al. Relation of polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene to transfer protein activity and plasma lipoprotein levels in alcohol drinkers. *Atherosclerosis* 1994; 110: 35-44.
- <sup>247</sup> Corella D, Sáiz C, Guillén M et al. Association of Taq IB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with plasma lipid levels in a healthy Spanish population. *Atherosclerosis* 2000; 152: 367-76.
- <sup>248</sup> Cuchel M, Wolfe ML, de Lemos AS et al. The frequency of the cholesteryl ester transfer protein-TaqI B2 allele is lower in Africans Americans than in Caucasians. *Atherosclerosis* 2002; 163: 169-74.
- <sup>249</sup> Arai H, Yamamoto A, Matsuzawa Y et al. Polymorphism in Four Genes Related to Triglycerides and HDL-cholesterol Levels in the General Japanese Population in 2000. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12: 240-50.
- <sup>250</sup> Sy RG, Cutiongco EM, Punzalan FE et al. Human Cholesteryl Ester Transfer Protein (Taq IB) Polymorphism among Filipinos with Cardiovascular Risk Factors. *J Atheroscler Thromb* 2007; 14: 116-21.
- <sup>251</sup> Hodoglugil U, Williamson DW, Huang Y et al. An interaction between the Taq IB polymorphism of cholesterol ester transfer protein and smoking is associated with changes in plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in Turks. *Clin Genet* 2005; 68: 118-27.
- <sup>252</sup> Gudnason V, Kakko S, Nicaud V et al. Cholesteryl ester transfer protein gene effect on CETP activity and plasma high-density lipoprotein in European populations. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 116-28.

- <sup>253</sup> Ikewaki K, Mabuchi H, Teramoto T et al. Association of Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity and TaqIB Polymorphism With Lipoprotein Variations in Japanese Subjects. *Metabolism* 2003; 52: 1564-70.
- <sup>254</sup> Nguyet N, Tuyet T, Ohmori R et al. Effect of the Cholesterol Ester Transfer Protein Genotypes on Plasma Lipid and Lipoprotein Levels in Vietnamese Children. *Pediatr Res* 2005; 58: 1249-53.
- <sup>255</sup> Freeman DJ, Packard CJ, Shepherd J et al. Polymorphisms in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein are related to plasma high-density lipoprotein cholesterol and transfer protein activity. *Clin Sci* 1990; 79: 575-81.
- <sup>256</sup> Freeman DJ, Griffin BA, Colmes AP et al. Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors: associations between the Taq I B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 336-44.
- <sup>257</sup> Marcel YL, McPherson R, Hogue M et al. Distribution concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects. *J Clin Invest* 1990; 85: 10-7.
- <sup>258</sup> Kuivenhoven JA, Knijff P, Boer JMA et al. Heterogeneity at the CETP Gene Locus. Influence on Plasma CETP Concentrations and HDL Cholesterol Levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 560-8.
- <sup>259</sup> Hsu LA, Ko YL, Hsu KH et al. Genetic variations in the cholesteryl transfer protein gene and high density lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese Chinese. *Hum Genet* 2002; 110: 57-63.
- <sup>260</sup> Corbex M, Poirier O, Fumaron F et al. Extensive association analysis between the CETP gene and coronary Heart disease phenotypes reveals several putatives functional polymorphisms and gene-environment interaction. *Genet Epidemiol* 2000; 1: 64-80.



- <sup>261</sup> Vohl MC, Lamarche B, Pascot A et al. Contribution of the cholesteryl ester transfer protein gene TaqIB polymorphism to the reduced plasma HDL-cholesterol levels found in abdominal obese men in features of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 918-25.
- <sup>262</sup> Mackness MI, Arrol S, Durrington PN et al. Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152-4.
- <sup>263</sup> Mackness B, Durrington PN and Mackness MI. Polymorphisms of paraonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet* 1999; 353: 468-9.
- <sup>264</sup> Mackness B, Mackness MI, Durrington PN et al. Paraonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 4-10.
- <sup>265</sup> Ombres D, Pannitteri G, Montali A et al. The Gln-Arg192 Polymorphism of Human Paraonase Gene Is Not Associated With Coronary Artery Disease in Italian Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1611-6.
- <sup>266</sup> Sanghera DK, Saha N, Aston CE et al. Genetic Polymorphism of Paraonase and the Risk of Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1067-73.
- <sup>267</sup> Odawara M, Tachi Y and Yamashita K. Paraonase Polymorphism (Gln<sup>192</sup>-Arg) Is Associated with Coronary Heart Disease in Japanese Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitas. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2257-60.
- <sup>268</sup> Arca M, Ombres A, Montali F et al. PONI L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 9-15.

- <sup>269</sup> Phuntuwate W, Suthisisang C, Koanantakul B et al. Paraoxonase 1 status in the Thai population. *J Hum Genet* 2005; 50: 293-300.
- <sup>270</sup> Sanghera DK, Saha N and Kamboh MI. The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 1998; 136: 217-23.
- <sup>271</sup> Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM et al. Paraoxonase 1 Mutations in a Turkish Population. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157: 174-7.
- <sup>272</sup> Sentí M, Tomás M, Elosua R et al. The paraoxonase-1 codon 192 polymorphism is associated with fasting total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations only in postmenopausal women. The REGICOR study. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 677-83.
- <sup>273</sup> Antikainen M, Murtomäki S, Syväanne M et al. The Gln-Arg191 Polymorphism of Human Paraoxonase Gene (HUMPONA) Is Not Associated with the Risk of Coronary Artery Disease in Finns. *J Clin Invest* 1996; 98: 883-5.
- <sup>274</sup> Ko Y-L, Ko Y-S, Wang S et al. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 1998; 141: 259-64.
- <sup>275</sup> Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M et al. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002; 16: 425-32.
- <sup>276</sup> Jarvik G, Tsai NT, McKinstry LA et al. Vitamin C and E Intake Is Associated With Increased Paraoxonase Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1329-33.

- <sup>277</sup> Sentí M, Aubo C, Elosua R et al. Effect of physical activity on lipid levels in a population-based sample of men with and without the Arg192 variant of the human paraoxonase gene. *Genet Epidemiol* 2000; 18: 276-86.
- <sup>278</sup> Srinivasan S, Shengxu Li, Chen W et al. R219K Polymorphism of the ABCA1 Gene and its Modulation of the Variations in serum High-Density Lipoprotein Cholesterol and Triglycerides related to Age and Adiposity in white versus black young adults. The Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 2003; 52: 930-4.
- <sup>279</sup> Harada T, Imai Y, Nojiri T et al. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 2003; 169: 105-12.
- <sup>280</sup> Yamakawa K, Yanagi H, Yu Yu et al Associations Between serum High-Density Lipoprotein Cholesterol or Apolipoprotein AI Levels and Common Genetic Variants of the ABCA1 Gene in Japanese School-aged Children. *Metabolism* 2004; 53: 182-6.
- <sup>281</sup> Brousseau ME, Bodzioch M, Schaefer EJ et al. Common variants in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2001; 154: 607-11.
- <sup>282</sup> Kakko S, Kelloniemi J, von Rohr P et al. ATP-binding cassette transporter A1 locus is not a major determinant of HDL-C levels in a population at high risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003; 166: 285-90.
- <sup>283</sup> Kaminski W, Piehler A and Wenzel J. ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 510-24.
- <sup>284</sup> Benton JL, Ding J, Tsai MY et al. Association between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2007; 193: 352-60.

<sup>285</sup> Clee SM, Kastelein JP, van Dam et al. HDL cholesterol levels and artery disease in heterozygotes for ABCA1 mutations are predicted by cholesterol efflux levels and influenced by age. *J Clin Invest* 2000; 106: 1263-70.

<sup>286</sup> Garcés C, Benavente M, Cano B et al. Effects of Dehydroepiandrosterone-sulfate on the Apo E Genotype Influence on Plasma Lipid Levels in Prepubertad Children. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3997-4000.